



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO
SEMIÁRIDO**

Bruna Bortoloni Gouveia

**CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS
CAPRINOS: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO E FSH EM
MEIO DE BASE DE EXTRATO DE *AMBURANA CEARENSIS***

PETROLINA

2016

BRUNA BORTOLONI GOUVEIA

**CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS
CAPRINOS: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO E FSH EM
MEIO DE BASE DE EXTRATO DE *AMBURANA CEARENSIS***

Trabalho apresentado à Universidade Federal do Vale do São Francisco – UNIVASF, Campus de Ciências Agrárias, como requisito para obtenção do título de mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Helena Tavares de Matos.

PETROLINA

2016

	Gouveia, Bruna Bortoloni
G719c	Cultivo <i>in vitro</i> de folículos secundários caprinos: efeito da suplementação e FSH em meio de base de extrato de <i>Amburana cearensis</i> / Bruna Bortoloni Gouveia. -- Petrolina, 2016. 118 f.: il.; 29 cm.
	Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido) - Universidade Federal do Vale do São Francisco, Campus Ciências Agrárias, Petrolina, 2016. Orientadora: Profa. Maria Helena Tavares De Matos. Referências. 1. Caprinos - Reprodução. 2. Oócito. 3. Plantas Medicinais. I. Título. II. Universidade Federal do Vale do São Francisco.
	CDD 636.39082

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Integrado de Biblioteca SIBI/UNIVASF

UNIVERSIDADE FEDERAL DO VALE DO SÃO FRANCISCO
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS VETERINÁRIAS NO
SEMIÁRIDO

Bruna Bortoloni Gouveia

CULTIVO *IN VITRO* DE FOLÍCULOS SECUNDÁRIOS
CAPRINOS: EFEITO DA SUPLEMENTAÇÃO E FSH EM MEIO
DE BASE DE EXTRATO DE *AMBURANA CEARENSIS*

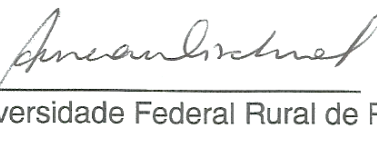
Dissertação apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Veterinárias no Semiárido, pela Universidade Federal do Vale do São Francisco.

Aprovada em: 29 de fevereiro de 2016.

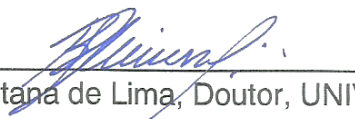
Banca Examinadora



(Maria Helena Tavares de Matos, Doutora, UNIVASF)



(Aurea Wischral, Doutora, Universidade Federal Rural de Pernambuco - UFRPE)



(Ricardo Santana de Lima, Doutor, UNIVASF)

Ao meu avô materno José de Paula (*in memoriam*),
por ter sido um exemplo de ser humano e amor que
quero seguir e que levarei para minha vida toda.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, que me deu a vida, fé e força para seguir meu caminho.

À Universidade Federal do Vale do São Francisco, que através de sua estrutura educadora (professores, secretários, técnicos e coordenadores), contribuiu para minha formação profissional.

À minha mãe Mônica Ferreira Bortoloni Gouveia, por ter me gerado e guiado por todo esse tempo o meu caminho, dando-me força e apoio em todos os momentos.

Ao meu Pai Antero Monteiro Gouveia, por estar sempre ao meu lado, apoiando-me e incentivando nos estudos.

Aos meus irmãos Laís Bortoloni Gouveia e Rafael Bortoloni Gouveia, por terem compreendido e me apoiado nos momentos precisos.

A Gabriel Lucas L. da Silva Santos, meu companheiro, amigo, namorado, por ter me apoiado nos momentos difíceis e acompanhado nessa conquista.

A todos os meus amigos que estão sempre torcendo por mim, que, a cada conquista minha, ficam felizes junto a mim, e por compreenderem a minha ausência, às vezes, devido os caminhos que escolhi seguir. Obrigada Diva Maria, Erick Galvão, Melyna Alane, Meiryanne Barbosa, Carliana Araújo, Renata Lopes e Tamilyes Dantas.

À minha orientadora Professora Dr^a. Maria Helena Tavares de Matos, pela oportunidade de realizar os primeiros passos na iniciação científica e ter mostrado o valor que esta representa na minha formação; pela orientação e apoio em todos os aspectos e por ser um exemplo de pessoa no qual me espelho.

Ao grupo de pesquisa Biotecnologia Aplicado ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos (BIOFOV), pelas tardes de seminários e de aprendizado, que não vou esquecer; pela ajuda para que tudo desse certo. Obrigada, Thae Lanne Lins,

Vanúzia Gonçalves, Taís Jobard, Ricássio Barberino, Jamile Maiara, Vanessa Barros, Agnes Yasmin Cavalcante, Maria Éllida Bezerra, Alane Pains, Melissa Müller, Lara Rios, Vítor Felix e Victória Correia.

Ao Prof. Dr. Jackson Roberto Guedes da Silva Almeida pelo fornecimento do extrato de *Amburana cearensis* utilizado neste trabalho.

À Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco – FACEPE, pelo fornecimento da bolsa de mestrado.

Aos componentes da banca, pela contribuição para a conclusão dessa grande etapa.

“Jamais considere seus estudos como
uma obrigação, mas como uma oportunidade
invejável para aprender a conhecer
a influência libertadora da beleza
do reino do espírito, para seu próprio
prazer pessoal e para proveito da comunidade”

Albert Einstein

RESUMO

A *Amburana cearensis*, planta típica do bioma Caatinga, vem se destacando por sua ação terapêutica, além de apresentar atividades citoprotetora e antioxidante em diferentes tipos celulares. No entanto, o extrato da *A. cearensis* nunca foi utilizado como meio de base no cultivo de folículos secundários caprinos, na presença ou ausência de suplementos e/ou FSH. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do extrato de *A. cearensis* adicionado ou não de suplementos e/ou FSH sobre o desenvolvimento *in vitro* e a apoptose de folículos secundários caprinos isolados, bem como, avaliar os níveis intracelulares de glutatona (GSH) e a atividade mitocondrial. No experimento 1, folículos secundários caprinos foram cultivados, por 12 dias, em α -MEM ou em meio composto por diferentes concentrações do extrato de *A. cearensis* (0,1; 0,2 ou 0,4 mg/mL), ambos sem adição de suplementos. Para o experimento 2, os folículos foram cultivados em α -MEM ou 0,2 mg/mL de *A. cearensis*, sem suplementos, ou nestes meios suplementados com albumina sérica bovina (BSA), insulina, transferrina, selênio, glutamina, hipoxantina e ácido ascórbico (grupos α -MEM⁺ ou Amb 0.2⁺), ou ainda nestes últimos meios adicionados também de FSH sequencial (sendo do dia 0 ao dia 6 = 100 ng/mL de FSH; do dia 6 ao dia 12 = 500 ng/mL de FSH), constituindo os grupos α -MEM⁺ + FSH e Amb 0,2⁺ mg/mL + FSH. Ao final do cultivo, os folículos foram avaliados quanto sua morfologia, formação de antro, diâmetro, taxa de recuperação de oócito ≥ 110 μ m e taxa de crescimento (experimentos 1 e 2), e quanto à apoptose, níveis de GSH e atividade mitocondrial (experimento 2). Os resultados do experimento 1 mostraram que o extrato de *A. cearensis*, na concentração de 0,2 mg/mL (sem suplementos), manteve a percentagem de folículos morfologicamente normais semelhante ao meio controle (α -MEM) e superior as demais concentrações (0,1 ou 0,4 mg/mL de *A. cearensis*). Além disso, esta concentração (0,2 mg/mL) foi a única que obteve a taxa de recuperação de oócitos ≥ 110 μ m semelhante ao meio controle. No experimento 2, após 12 dias de cultivo, todos os meios suplementados apresentaram percentagens de folículos normais mais elevadas que os meios isentos de suplementos. Além disso, a adição de FSH de forma sequencial aos meios de cultivo de base (α -MEM⁺ + FSH e Amb 0,2⁺ mg/mL + FSH) promoveu aumento nas taxas de formação de antro, recuperação de oócitos ≥ 110 μ m, níveis de GSH e atividade mitocondrial em comparação aos meios isentos de suplementos (α -MEM ou Amb 0,2 mg/mL). O tratamento Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH apresentou taxas de crescimento diário semelhantes a Amb 0,2⁺ mg/mL e significativamente maiores aos outros tratamentos. Além disso, folículos cultivados em Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH apresentaram taxas de crescimento total significativamente mais elevadas do que os outros tratamentos. Em conclusão, o extrato de *A. cearensis*, na concentração de 0,2 mg/mL, adicionado de suplementos e FSH, pode ser utilizado com sucesso como meio de cultivo de folículos secundários caprinos.

Palavras-chave: Antioxidante. Cabra. Crescimento. Oócito. Plantas Medicinais.

ABSTRACT

Amburana cearensis, a plant from Caatinga biome, have drawn increasing attention due to its therapeutical action, cytoprotective and antioxidants activities in different types of cells. However, the extract of *A. cearensis* has never been used as a medium for *in vitro* culture of caprine preantral follicles, in the presence or absence of supplements and/or FSH. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of *A. cearensis* extract added or not by supplements and/or FSH on the *in vitro* development and apoptosis of isolated caprine secondary follicles, as well as to analyze the intracellular levels of glutathione (GSH) and mitochondrial activity. In experiment 1, caprine secondary follicles were cultured for 12 days in α -MEM or in medium composed of different concentrations of *A. cearensis* extract (0.1; 0.2 or 0.4 mg/mL), both without supplementation. For experiment 2, follicles were cultured in α -MEM or 0.2 mg/mL *A. cearensis*, without supplements, or in these media supplemented with bovine serum albumin (BSA), insulin, transferrin, selenium, glutamine, hypoxanthine and ascorbic acid (groups α -MEM⁺ or Amb 0.2 mg/mL⁺), or in these latter media also added by sequential FSH (from day 0 to 6 = 100 ng/mL FSH; from day 6 to 12 = 500 ng/mL FSH), constituting α -MEM⁺ + FSH and Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH groups. At the end of the culture, follicles were evaluated according to morphology, antrum formation, recovery rate of oocyte $\geq 110 \mu\text{m}$ and growth rates (experiments 1 and 2), and apoptosis, GSH levels and mitochondrial activity (experiment 2). The results of experiment 1 showed that *A. cearensis* extract, at 0.2 mg/mL (without supplements), maintained the percentage of morphologically normal follicles similar to the control medium (α -MEM) and higher than other concentrations (0.1 ou 0.4 mg/mL de *A. cearensis*). Moreover, this concentration (0.2 mg/mL) was the only one that promotes recovery rates of oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$ similar to controls. In experiment 2, after 12 days of culture, all supplemented media showed percentage of normal follicles higher than non-supplemented media. Furthermore, addition of FSH in a sequential way to the basic culture media (α -MEM⁺ + FSH e Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH) promoted an increase in the antrum formation, recovery rates of oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$, GSH level and mitochondrial activity in comparison to media without supplements (α -MEM ou Amb 0.2 mg/mL). Treatment composed of Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH showed daily growth rates similar to that observed in Amb 0.2⁺ mg/mL and significantly higher than other treatments. In addition, follicles cultured in Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH showed rates of total growth significantly higher than other treatments. In conclusion, the extract of *A. cearensis*, at 0.2 mg/mL, added by supplements and FSH, can be used successfully as a culture medium for caprine secondary follicles.

Key-words: Antioxidant. Goat. Growth. Oocyte. Medicinal Plants.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

- Figura 1** - Desenho esquemático do ovário mamífero. Fonte: Adaptado de ROSSETO, 2013. 22
- Figura 2** - Representação esquemática dos processos de oogênese e foliculogênese. Fonte: ROSSETO, 2013. 23
- Figura 3** - Representação esquemática da atuação da via PI3K/AKT/FOXO3 na ativação de folículos primordiais. Fonte: Adaptado de Lima et al., 2010. 25
- Figura 4** - Representação esquemática das principais vias moleculares que levam à apoptose. Fonte: Adaptado de MACEDO; CARNEIRO; MATAYOSHI, 2007. 29
- Figura 5** - Figura representativa da *Amburana cearensis* (A) e suas diferentes partes: folha (B), fruto (C) e semente (D). Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2011. 37
- Figura 6** - Imagens fluorescentes para H2DCFDA (A), CellTracker® Blue (B) e Mitotracker® Red (C). Barra de escala: 60 µm. Fonte: arquivo pessoal. 42
- Figura 7** – Imagens fluorescentes demonstrando oócito com marcação para TUNEL (A) e Hoescht 33342 (B). Setas indicam a marcação fluorescente na cromatina. Barra de escala: 60 µm. Fonte: arquivo pessoal. 43

CAPÍTULO 1

- Figura 1** - Protocolo experimental do cultivo *in vitro* de folículos secundários caprinos em diferentes meios. 52

Figura 2 - Folículos secundários morfologicamente normais no dia 0 (A e D), folículos antrais (B e E), atresico (C) e extruso (F) após 6 dias de cultivo. Experimento 1: A-C; Experimento 2: D-F. GC: células da granulosa; O: oócito. Seta: cavidade antral. Barra de escala: 250 μm (100x ampliação).

57

Figura 3 - Experimento 1: Percentagens de folículos morfologicamente normais (A), formação de antro (B), diâmetro folicular (C) e taxa de crescimento diário (D) em α -MEM ou diferentes concentrações de extrato *Amburana cearensis* (Amb 0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL). (A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$); (a, b, c) Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de cultivo no mesmo tratamento ($P < 0,05$).

58

Figura 4 - Experimento 2: Percentagens de folículos morfologicamente normais (A), formação de antro (B), diâmetro folicular (C) e taxa de crescimento diário (D) em α -MEM ou em extrato de *Amburana cearensis* (0,2 mg/mL), na ausência ou na presença de suplementos ou FSH. (A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$); (a, b, c) Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de cultivo no mesmo tratamento ($P < 0,05$).

60

Figura 5 - Representação da fragmentação de DNA em oócitos caprinos após 12 dias de cultivo. Folículo pré-antral normal em 0,2 mg/mL de *A. cearensis* (A e D), folículo apoptótico no controle positivo (B e E) e oócito normal no controle negativo (C e F). Oócitos marcados com TUNEL (A, B, C) e Hoechst 33342 (D, E, F). Note a fragmentação de DNA evidenciado pela cromatina marcada em verde na figura B. O: oócito. Barras de escala: 100 μm .

61

Figura 6 - Imagens epifluorescentes de oócitos caprinos marcados com CellTracker® Bleu (A-F) para detecção dos níveis intracelulares de GSH: oócitos cultivados em α -MEM (A) ou em Amb 0,2 mg/mL (B) (ambos sem suplementos), em α -MEM⁺ suplementado (C) ou em Amb 0,2⁺ mg/mL (D) e em α -MEM⁺ + FSH (E) ou Amb 0,2⁺ + FSH (F) e nível intracelular relativo

(pixel/oócito) de glutationa (GSH) em oócitos caprinos após 12 dias de cultivo *in vitro* em α -MEM ou em extrato de *A. cearensis* (0,2 mg/mL), na ausência ou presença de suplementos e/ou FSH (G). Barra de escala: 75 μ m. (A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

62

Figura 7 – Imagens epifluorescentes de oócitos caprinos marcados com MitoTracker® Red (A-F) para detecção dos níveis intracelulares de mitocôndrias ativas: oócitos cultivados em α -MEM (A) ou em Amb 0,2 mg/mL (B) (ambos sem suplementos), em α -MEM⁺ suplementado (C) ou em Amb 0,2⁺ mg/mL (D) e em α -MEM⁺ + FSH (E) ou Amb 0,2⁺ + FSH (F) e nível intracelular relativo (pixel/oócito) de mitocôndrias ativas em oócitos caprinos após 12 dias de cultivo *in vitro* em α -MEM ou em extrato de *A. cearensis* (0,2 mg/mL), na ausência ou presença de suplementos e/ou FSH (G). Barra de escala: 75 μ m. (A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

63

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

- Tabela 1** - Percentagem de oócitos completamente crescidos ($\geq 110 \mu\text{m}$) após 12 dias de cultivo de folículos pré-antrais caprinos em α -MEM ou em diferentes concentrações de extrato de *Amburana cearensis*. 58
- Tabela 2** - Percentagem de oócitos completamente crescidas ($\geq 110 \mu\text{m}$) após 12 dias de cultivo de folículos pré-antrais caprinos em α -MEM ou em extrato de *Amburana cearensis* (0,2 mg/mL), na ausência ou na presença de suplementos ou FSH. 60

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

2D	Bidimensional
3D	Tridimensional
≥	Maior ou igual
%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
α-MEM	Meio Essencial Mínimo-alfa modificado
µg	Micrograma(s)
µL	Microlitro(s)
µm	Micrômetro(s)
µM	Micromolar
Amb	<i>Amburana cearenses</i>
ANOVA	Análise de variância
AG	Ácido gálico
AIF	Fator Indutor da Apoptose
AKT	Proteína quinase
ATP	Adenosina trifosfato
BMP	Proteína Morfogenética Óssea
BSA	Albumina sérica bovina
CAT	Catalase
CGP	Células germinativas primitivas
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CO ₂	Dióxido de carbono
DCF	2'-7'dichlorofluoresceína
DISCO	Complexo de sinalização indutor de morte
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOX	Doxorubicina
EGF	Fator de Crescimento Epidermal
Endo G	Endonuclease G
EROs	Espécies reativas de oxigênio
FADH ₂	Flavina adenina dinucleotideo

FGF-2	Fator de Crescimento Fibroblástico-2
FOXO3	Fator de transcrição Forkhead BOX O3
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
H	Horas
GSH	Glutathiona
GPX	Glutathiona peroxidase
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
H ₂ DCF	Dichlorofluoresceína 2'-7
H ₂ DCFDA	2', 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína
HO-1	Heme oxigenase-1
IGF-1	Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1
KL	Kit Ligand
LDL	Lipoproteína de baixa densidade
LH	Hormônio Luteinizante
LIF	Fator Inibitório da Leucemia
m	Metro(s)
MAPKs	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
MEM	Meio Essencial Mínimo
mg	Miligrama(s)
mL	Mililitro(s)
mM	Milimolar
MOIFOPA	Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais
MOMP	Membrana mitocondrial externa
NADH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo
ng	Nanograma
P < 0,05	Probabilidade de erro menor do que 5%
PBS	Tampão fosfato-salino
PCA	Ácido protocateuico
pH	Potencial hidrogeniônico
PI3K	Fosfatidilinositol-3-cinases
Pten	Fosfatase lipídica específica do oócito
Tdt	Enzima deoxinucleotídeo transferase

TNF α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TUNEL	Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling
ZP	Zona pelúcida

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO	19
2.	DESENVOLVIMENTO	21
	2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	21
	2.1.1. Oogênese e foliculogênese mamíferos	21
	2.1.1.1. Formação e caracterização dos folículos pré-antrais	24
	2.1.1.2. Formação e caracterização dos folículos antrais	26
	2.1.2. População e atresia folicular	27
	2.1.2.1. Estresse oxidativo e metabolismo energético folicular	30
	2.1.3. Biotécnica MOIFOPA	32
	2.1.4. Cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	32
	2.1.4.1. Meios utilizados no cultivo <i>in vitro</i> de folículos pré-antrais	34
	2.1.5. Uso terapêutico de plantas medicinais	35
	2.1.5.1. Uso e aplicações da <i>Amburana cearensis</i>	36
	2.1.6. Técnicas utilizadas para avaliação da qualidade folicular durante o cultivo <i>in vitro</i>	40
	2.2. JUSTIFICATIVA	44
	2.3. OBJETIVOS	45
	2.3.1. Objetivo geral	45
	2.3.2. Objetivos específicos	45
	2.4. CAPITULO 1	46
3.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	67
	REFERÊNCIAS	68
	ANEXO 1	83

1. INTRODUÇÃO

A compreensão da fisiologia ovariana em caprinos, associada ao desenvolvimento de biotecnologias na área da reprodução animal, abrem inúmeras possibilidades para proporcionar um melhoramento genético dos rebanhos e um aumento na produtividade destes animais, que desempenham um importante papel sócio-econômico no Nordeste Brasileiro. Dentre as biotécnicas da reprodução, destaca-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA), também conhecida como Ovário Artificial.

Um dos objetivos do ovário artificial é o desenvolvimento de um sistema de cultivo *in vitro* ideal que permita o crescimento folicular até a maturação oocitária, prevenindo o processo de atresia que ocorre largamente nos ovários (FIGUEIREDO et al., 2011). Porém, para alcançar este objetivo, cuidados especiais com a composição do meio de cultivo devem ser tomados.

O meio de cultivo deve garantir o fornecimento adequado de eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (PICTON et al., 2008). O Meio Essencial Mínimo-alfa modificado (α -MEM) é o meio de cultivo de folículos e oócitos mais comumente utilizado em caprinos (CHAVES et al., 2012; BARROS et al., 2013). Além disso, com o objetivo de melhorar o desenvolvimento folicular, alguns suplementos têm sido constantemente adicionados ao α -MEM, tais como antioxidantes, hormônios e/ou fatores de crescimento (ABEDELAKHI et al., 2010; ANDRADE et al., 2012). Entre os suplementos, o Hormônio Folículo-Estimulante (FSH) tem sido amplamente utilizado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em várias espécies, mantendo a viabilidade, reduzindo a apoptose e promovendo o crescimento folicular (GUTIERREZ et al., 2000; SARAIVA et al., 2010; BARROS et al., 2013). Entretanto, os meios comerciais e suplementos são caros, o que torna os sistemas de cultivo *in vitro* mais onerosos. Diante disso, buscam-se meios alternativos, que possam minimizar os custos, destacando-se o uso de produtos naturais do bioma Caatinga, como as plantas medicinais.

Dentre as plantas mais conhecidas da Caatinga, a *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith (ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007; CARTAXO et al., 2010), popularmente conhecida como "Cumaru", "Amburana de cheiro" ou "Umburana", tem demonstrado efeito antioxidante *in vitro* (LEAL et al., 2010). Esta planta possui compostos fenólicos, especialmente flavonoides, fenóis e glicosídeos (ácido gálico,

ácido protocatecuico, ácido p-cumárico, quercetina e amburosídeos A e B) (CANUTO; SILVEIRA, 2006; GOUVEIA et al., 2015), que podem atuar como antioxidantes naturais, reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs), peroxidação lipídica, danos no DNA e modulando a expressão de enzimas antioxidantes, como a glutatona (GSH), em diferentes tipos celulares (MARTÍN-ARAGÓN et al., 1998; LEAL et al., 2005; RUIJTERS et al., 2013; KIM et al., 2014)

Estudos recentes realizados por nossa equipe mostraram que o extrato de *A. cearensis* pode ser utilizado na conservação de tecido ovariano caprino a 4°C por 6 h, mantendo as porcentagens de folículos normais semelhantes às observadas no meio controle (MEM) (GOUVEIA et al., 2015). Este extrato pode ainda ser utilizado como meio de cultivo de folículos pré-antrais ovinos, mantendo a sobrevivência e estimulando o desenvolvimento folicular *in vitro* (BARBERINO et al., 2015). Entretanto, ainda não há estudos avaliando o efeito do extrato de *A. cearensis*, adicionado ou não de suplementos e/ou FSH, sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

2. DESENVOLVIMENTO

2.1. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

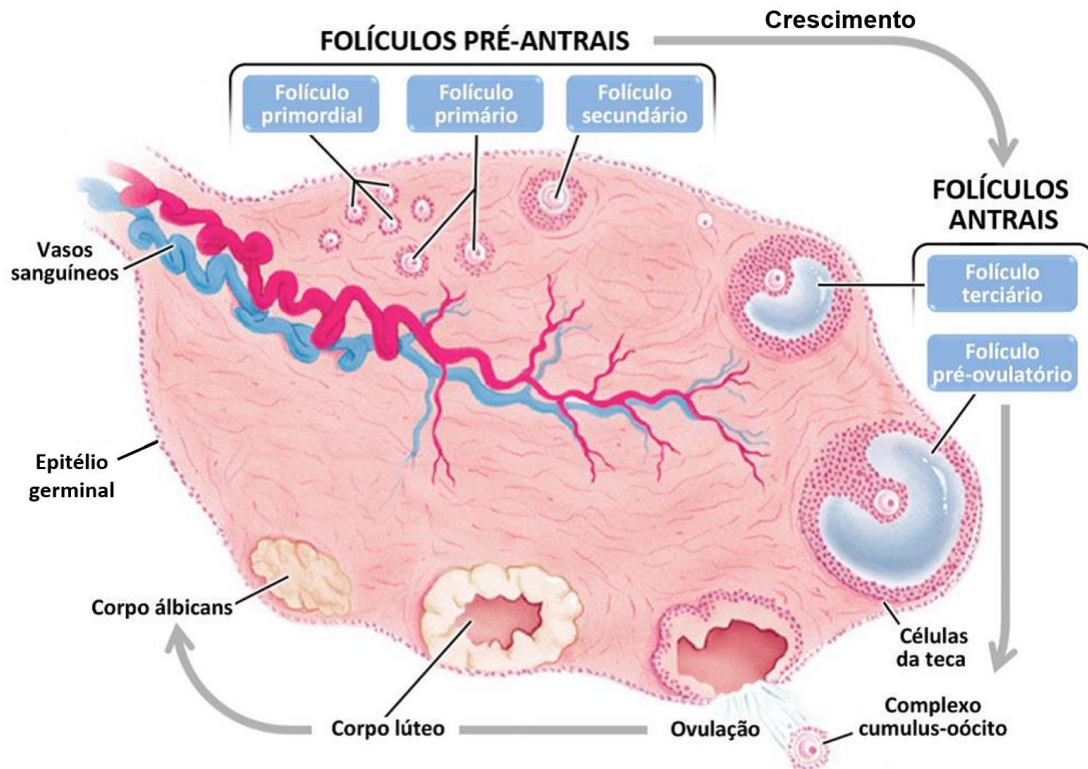
2.1.1. Oogênese e foliculogênese em mamíferos

O ovário mamífero é constituído por diferentes tipos celulares e caracteriza-se estrutural, funcional e morfológicamente por conter milhares de estruturas denominadas de folículos ovarianos (LEITÃO et al., 2009). O folículo ovariano contém um oócito circundado por células da granulosa e/ou tecais (FIGUEIREDO et al., 2007) e desempenha funções exócrina (ovulação do oócito) e endócrina (produção e secreção de esteróides e peptídeos). Sabe-se que, em todas as espécies mamíferas, o ovário é composto de duas regiões distintas, uma medular e outra cortical, circundado pelo epitélio germinal (Figura 1) (BAILLET; MANDON-PEPIN, 2012). Na maioria das espécies, a medula ovariana está localizada mais internamente e consiste de um arranjo irregular de tecido conjuntivo fibroelástico e um extensivo tecido nervoso e vascular que chega ao ovário através do hilo (SILVA, 2005). Já na região cortical, mais externamente, estão localizado folículos ovarianos, em distintos estágios de desenvolvimento, corpos lúteos, hemorrágicos e albicans (LIU et al., 2006; RICHARDS; PANGAS, 2010).

Na maioria das fêmeas mamíferas, a formação dos folículos ovarianos, unidades morfofuncionais do ovário, inicia-se ainda no período pré-natal e engloba os processos de oogênese e foliculogênese (FIGUEIREDO et al., 2008; MATSUDA et al., 2012). A oogênese inicia-se antes e termina após a foliculogênese (LIM; CHOI, 2012). A oogênese consiste na formação, crescimento, capacitação e maturação do oócito (HENNET; COMBELLES, 2012), tendo o seu início marcado pela migração das células germinativas primitivas (CGP), originárias do endoderma do saco vitelínico, para a região das gônadas primitivas. No início da fase ativa da sua migração, as CGP modificam as suas características morfológicas e bioquímicas, adquirindo uma forma alongada (PALMA et al., 2012). Alguns fatores podem atuar na formação das CGPs (Proteína Morfogenética Óssea 2/4/8b – BMP 2/4/8b), outros na sobrevivência (Kit Ligand - KL e Fator Inibitório da Leucemia - LIF), migração (KL) ou diferenciação destas células (Fator de Crescimento Fibroblástico 2 - FGF-2 e Fator de Necrose Tumoral-alfa - TNF α) (VAN DEN HURK;

ZHAO, 2005). Defeitos no desenvolvimento, migração ou proliferação das CGPs podem levar a seu esgotamento, gerando um possível quadro de infertilidade precoce (JAGARLAMUDI et al, 2012).

Figura 1 - Desenho esquemático do ovário mamífero.



Fonte: Adaptado de ROSSETO, 2013

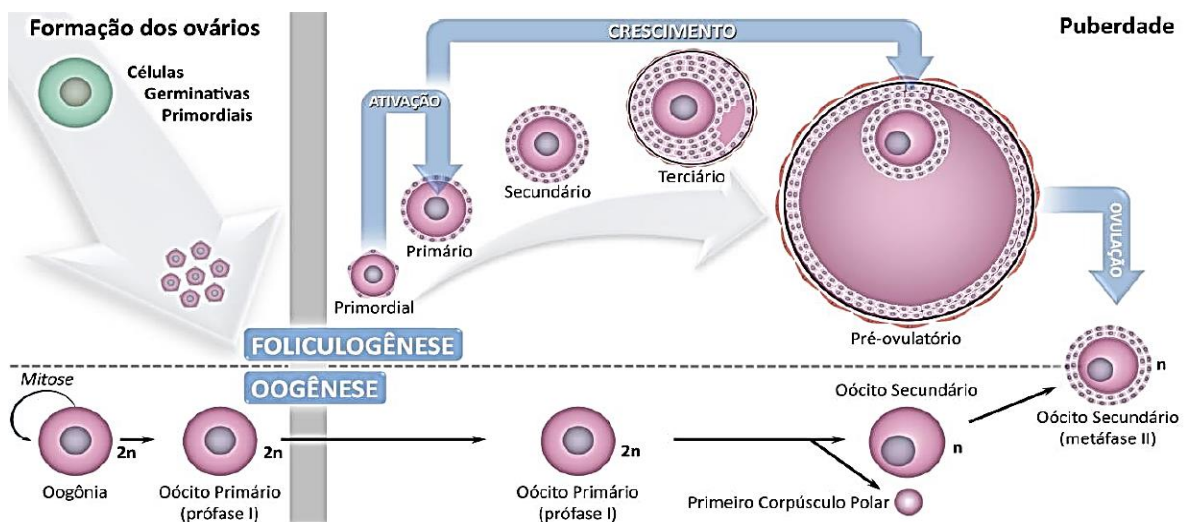
Após um processo marcado pelo crescimento celular e pela redistribuição de organelas citoplasmáticas, as CGP dentro do ovário multiplicam-se ativamente e transformam-se em oogônias, as quais possuem alta atividade mitótica e transcricional. Em seguida, as oogônias entram na primeira divisão meiótica e se transformam em oócitos primários, passando pelos estágios da prófase I (leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno). No estágio de diplóteno ou vesícula germinativa da prófase I, ocorre a primeira interrupção da divisão meiótica dos oócitos primários, que permanecem neste estágio até a puberdade (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005; FIGUEIREDO et al., 2008; CHEN et al., 2012). Assim como a oogônia, o oócito primário é diplóide contendo dois conjuntos completos de cromossomos ($2n$) (LIM; CHOI, 2012). Com a liberação do pico pré-ovulatório do Hormônio Luteinizante (LH)

e conseqüente retomada da meiose, ocorre a formação de oócitos secundários haplóides (n) e a segunda parada da meiose, na fase de metáfase II (HUTT; ALBERTINI, 2007). A meiose será retomada novamente após a fecundação do oócito pelo espermatozoide, originando o oócito haploide fecundado, marcando, assim, o fim do desenvolvimento oocitário (FIGUEIREDO et al., 2008).

Simultaneamente à oogênese, ocorre a foliculogênese, que é definida como o processo de formação, crescimento, maturação folicular (ROCHA et al., 2013), iniciando com a formação do folículo primordial e culminando com o folículo de DeGraaf ou pré-ovulatório (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). A foliculogênese é um processo complexo que depende de numerosos fatores, incluindo os fatores extra e intra-ovarianos (LIM; CHOI, 2012).

Ao longo do desenvolvimento folicular, a morfologia dos folículos é alterada, sendo verificado o crescimento do oócito, a multiplicação e diferenciação das células da granulosa, bem como o aparecimento das células tecais (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006). Com base nas mudanças morfológicas observadas durante a progressão folicular, os folículos podem ser classificados em: I) pré-antrais ou não-cavitários, que abrangem os folículos primordiais, de transição, primários e secundários; e em II) antrais ou cavitários, compreendendo os folículos terciários e de De Graaf ou pré-ovulatórios (SILVA et al., 2004). A Figura 2 ilustra algumas etapas relacionadas aos processos de oogênese e foliculogênese.

Figura 2 - Representação esquemática dos processos de oogênese e foliculogênese.



Fonte: ROSSETO, 2013

2.1.1.1. Formação e caracterização dos folículos pré-antrais

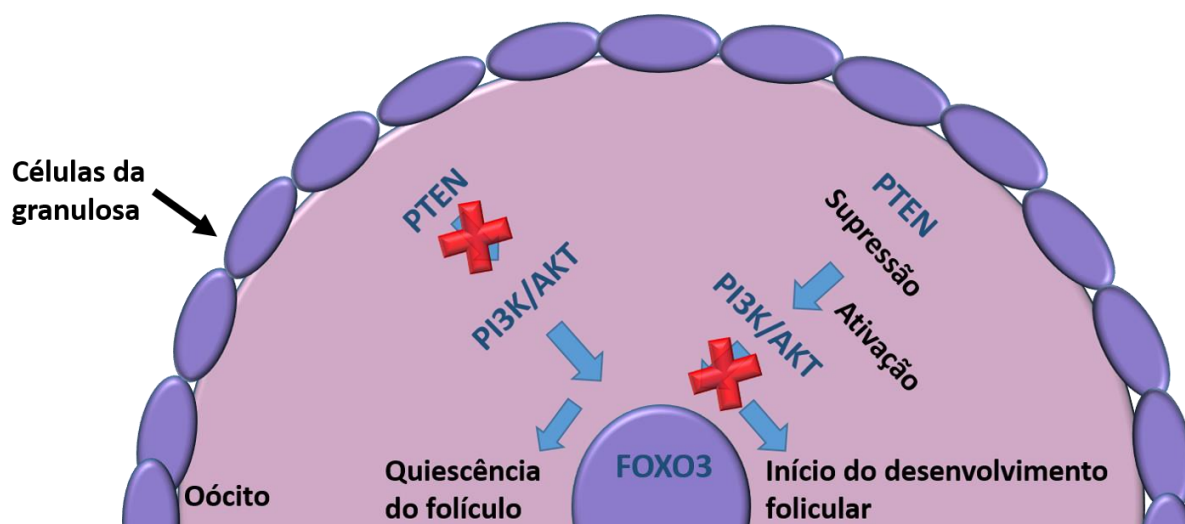
Os folículos pré-antrais representam 90% da população folicular e são responsáveis pela renovação contínua de folículos antrais no ovário (KATSKA-KSIAZKIEWICZ, 2006). Os folículos primordiais, que são os folículos mais precoces presentes no ovário e que representam 95% dos folículos pré-antrais, são formados quando os oócitos imaturos (em prófase I da meiose) começam a ser circundados por uma camada de células somáticas pavimentosas denominadas de células da pré-granulosa (FORTUNE et al., 2013). Estes folículos são considerados o *pool* de estoque de folículos ovarianos (FIGUEIREDO et al., 2008) e encontram-se em quiescência no ovário (BRISTOL-GOULD; WOODRUFF, 2006).

O desenvolvimento dos folículos primordiais pode ocorrer dias, meses ou anos após a sua formação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005) e a sua transição para o estágio de primário pode ser prolongada, sendo possível observar folículos com células da granulosa de morfologia pavimentosa e cúbica que são classificados, por alguns autores, como folículos de transição (SILVA et al., 2004). Os folículos primários, por sua vez, contêm uma única camada completa de células da granulosa de morfologia cúbica circundando o oócito (FORTUNE, 2003; SKINNER, 2005). A proliferação e mudança na morfologia das células da granulosa de pavimentosas para cúbicas, formando o folículo de transição (contendo células com morfologia pavimentosa e cúbica) e, em seguida, o folículo primário (contendo apenas células cúbicas) dá início ao crescimento folicular, também chamado de ativação (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005). Entretanto, os mecanismos e fatores envolvidos no processo de ativação folicular ainda não são bem elucidados.

Até o momento, sabe-se que o crescimento folicular inicial é dependente de fatores reguladores autócrinos e parácrinos e independente da ação de gonadotrofinas (KRISTENSEN et al., 2015). Dentre os fatores relacionados com a ativação de folículos primordiais, podem ser destacados o KL (ratas: PARROT; SKINNER, 1999; ovino: CAVALCANTE et al., 2015), FGF-2 (cabras: MATOS et al., 2007a), Fator de Crescimento Epidermal (EGF) (cabras: CELESTINO et al., 2009) e Fator de Crescimento Semelhante à Insulina-1 (IGF-1) (cabra: MARTINS et al., 2010; COSTA et al., 2014), LIF (ratas: NILSSON et al., 2002). Além destes, estudos demonstraram que fatores transcricionais também estão envolvidos no início do crescimento do folículo primordial, requerendo a expressão de alguns fatores, como

a via de sinalização fosfatidilinositol-3-quinases (PI3K). Como em outros sistemas orgânicos, a via de sinalização PI3K controla a ativação de folículos primordiais através do fator de transcrição Forkhead BOX O3 (FOXO3) (JOHN et al, 2008; REDDY et al., 2008). Isto foi demonstrado pela supressão específica da fosfatase lipídica específica do oócito (Pten), um antagonista potente da via PI3K. A Figura 3 demonstra que a supressão de Pten leva à ativação da proteína quinase AKT induzida pela via PI3K, hiperfosforilação do FOXO3, exportação nuclear do FOXO3 e ativação do folículo primordial no ovário (JO et al., 2007; REDDY et al., 2008).

Figura 3 – Representação esquemática da atuação da via PI3K/AKT/FOXO3 na ativação de folículos primordiais.



Fonte: Arquivo pessoal.

Com a formação do folículo primário e a multiplicação das suas células da granulosa, ocorre a formação de várias camadas destas células ao redor do oócito, formando os folículos secundários. Nesta categoria folicular, a presença da zona pelúcida (ZP) circundando o oócito já é claramente visível (LUCCI et al., 2001). Durante o seu crescimento, o oócito secreta uma glicoproteína de membrana que dará origem à zona pelúcida. A ZP forma uma camada protetora ao redor do oócito e é constituída por três glicoproteínas (ZP1, ZP2 e ZP3), com a expressão da ZP2 já acontecendo em folículos primordiais (ARAÚJO et al., 2014), sugerindo que material da ZP estão presentes desde o início da foliculogênese. Além disso, o crescimento folicular após o estágio de folículo primário é também caracterizado pelo aparecimento das células da teca recrutadas de seus precursores, presentes no

tecido circundante do estroma (PARROTT; SKINNER, 2000) e pelo acoplamento das células da granulosa, formando as junções gap com o oócito, que atravessam a ZP (SOYAL et al., 2000). As células da teca são fundamentais para o crescimento folicular, pois são a principal fonte de síntese de andrógenos no ovário, fornecendo precursores para a síntese de estrógeno nas células da granulosa (OKTEN; URMAN, 2010). As junções gap, por sua vez, facilitam a comunicação bidirecional e permitem a transferência de nutrientes, aminoácidos, nucleotídeos, hormônios, fatores de crescimento e sinais estimuladores e inibidores da meiose. Por meio das junções gap ou pelo contato célula-célula na superfície celular, o oócito em desenvolvimento pode promover o crescimento e a diferenciação das células foliculares, enquanto as células da granulosa asseguram o crescimento e diferenciação do oócito (VAN DEN HURK; ZHAO, 2005).

2.1.1.2. Formação e caracterização dos folículos antrais

Com o crescimento dos folículos secundários e organização das células da granulosa em várias camadas, ocorre a formação de uma cavidade repleta de líquido folicular, entre as camadas de células da granulosa, denominada antro, caracterizando os folículos terciários. A partir desse estágio, o diâmetro dos folículos aumenta significativamente, devido ao crescimento do oócito, as células da granulosa e da teca se multiplicam, ocorre um aumento da vascularização da camada da teca e um aumento da cavidade antral (SANCHEZ; SMITZ 2012; OKTEN; URMAN, 2010). Esta última possui um fluido composto de importantes substâncias para a manutenção do oócito, como água, eletrólitos, proteínas séricas e alta concentração de hormônios esteróides, secretados pelas células da granulosa (BARNETT et al., 2006). Nos folículos antrais, as células da teca sofrem alterações morfológicas e funcionais, e aquelas células localizadas próximas da membrana basal são denominadas teca interna, enquanto as localizadas periféricamente são classificadas como teca externa. As células da granulosa são diferenciadas em células do cumulus (próximas ao oócito) e células murais (MAGALHÃES et al., 2009).

O desenvolvimento dos folículos antrais é caracterizado por uma fase dependente de gonadotrofinas, as quais irão desencadear os mecanismos de crescimento, recrutamento, seleção e dominância folicular (VAN DEN HURK; ZHAO,

2005). Acredita-se que a dominância folicular inicia-se quando os folículos maiores passam a produzir altos níveis do IGF-1, estradiol e inibina, responsáveis por modular a liberação de FSH pela adenohipófise (DRIANCOURT, 2001). No último estágio do desenvolvimento folicular, observa-se a formação do folículo pré-ovulatório. Este é caracterizado por um oócito circundado por células da granulosa especializadas que são denominadas de células do cúmulo. As células da granulosa de folículos pré-ovulatórios param de se multiplicar em resposta ao LH e iniciam o programa final de diferenciação. A ovulação do oócito e células do cúmulo ocorrem em resposta ao pico pré-ovulatório de LH (MATSUDA et al., 2012). Em todas as espécies, a formação de folículos pré-ovulatórios ocorre, geralmente, a partir da puberdade (DRIANCOURT, 2001).

2.1.2. População e atresia folicular

Um dogma da biologia da reprodução das fêmeas defende que a reserva folicular é definida na vida fetal ou logo após o nascimento, sendo esta uma fonte não renovável, a qual é reduzida significativamente com a idade. Entretanto, estudos atuais indicam que pode haver a formação de oócitos após o nascimento (JOHNSON et al., 2004; WHITE et al., 2012), marcando, assim, o surgimento da teoria da neofoliculogênese. Estudo recente demonstrou o nascimento de filhotes de camundongos após a fecundação *in vitro* de oócitos originados a partir de células-tronco germinativas (ZOU et al., 2009). Estes estudos apontam para uma grande mudança de paradigma na biologia reprodutiva de fêmeas mamíferas. No entanto, outros estudos devem ser realizados na tentativa de demonstrar a ocorrência da neofoliculogênese em outras espécies, bem como a capacidade de desenvolvimento, maturação e fecundação destes oócitos formados após o nascimento.

Independente da neofoliculogênese, a população folicular difere entre as espécies, sendo que os folículos pré-antrais representam 90% do total de folículos presentes no ovário e constituem o estoque de gametas femininos, podendo estes crescerem naturalmente *in vivo* ou estarem aptos ao crescimento e maturação quando cultivados *in vitro* (FIGUEIREDO et al., 2011; LIMA et al., 2013). A população folicular caprina é de aproximadamente 35.000 (LUCCI et al., 1999). Apesar desta grande população folicular presente no ovário caprino, a quase

totalidade dos folículos, ou seja, 99,9%, não alcança a ovulação, morrendo por um processo fisiológico denominado atresia (MATSUDA et al., 2012). Apesar da grande perda folicular, este é um processo importante para a manutenção da ciclicidade ovulatória animal (AMSTERDAM et al., 2003). O processo de atresia folicular nos animais domésticos e primatas tem início ainda na vida fetal (PALMA et al., 2012) e pode ocorrer por via apoptótica ou pelo processo degenerativo de necrose (CHEN et al., 2005; VALDEZ et al., 2005).

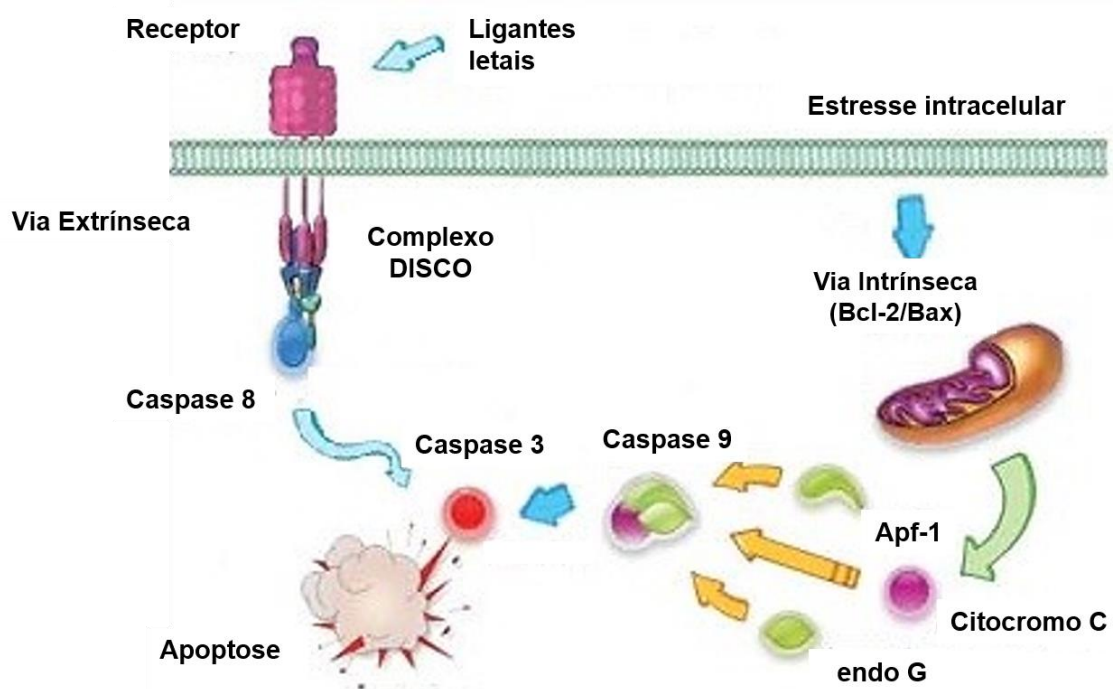
O processo de apoptose é controlado por proteínas intracelulares (proteínas anti e pró-apoptóticas) e é o principal responsável pela perda da reserva ovariana (GOUGEON, 2010). Sabe-se que este é um evento geneticamente programado, caracterizado por uma série de alterações bioquímicas e morfológicas, como a extensiva perda de volume celular, condensação da cromatina, fragmentação do DNA e formação de corpos apoptóticos (RACHID et al., 2000). De modo geral, dois mecanismos participam da apoptose: um mecanismo é desencadeado pela ligação de moléculas de morte celular com os receptores da superfície (eventos de morte mediada pelo receptor), caracterizando a via extrínseca da apoptose, enquanto o outro é gerado por sinais que surgem no interior da célula (eventos mediados por mitocôndrias), caracterizando a via intrínseca da apoptose (HUSSEIN et al., 2003; Figura 4).

A via extrínseca é iniciada por hormônios extracelulares ou agonistas que pertencem à superfamília do Fator de Necrose Tumoral (TNF), incluindo o TNF- α , Fas/CD95 ligante, Apo2 e TRAIL. Estes agonistas reconhecem e ativam seus receptores correspondentes, os membros da família de receptores de TNF/NGF, tais como TNFR1, Fas/CD95 e Apo2. Em seguida, através de uma série de interações proteína-proteína, envolvendo domínios, que incluem o domínio de morte e o domínio efetor de morte, os receptores irão recrutar proteínas adaptadoras específicas para formar um complexo, chamado complexo de sinalização indutor de morte (DISCO). Este complexo recruta e ativa a caspase iniciadora (caspase-8), que ativam as caspases executoras, tais como a caspase-3 e caspase-7 (JIANG; WANG, 2004), responsáveis pela clivagem de proteínas essenciais, conduzindo à morte celular (HUTT, 2015).

Já a via intrínseca é ativada por estresses intracelulares (EROs, ausência de fatores de crescimento e hormônios), que podem afetar a mitocôndria, e determinam a permeabilização da membrana mitocondrial externa (MOMP). Esta, por sua vez,

resulta na dissipação do potencial da membrana mitocondrial e, por conseguinte, na cessação da produção de adenosina trifosfato (ATP), assim como liberação de uma série de proteínas que contribuem para a ativação da caspase (GREEN; KROEMER, 2004; YIVGI-OHANA et al., 2011). Dentre estas proteínas, estão o citocromo C, Fator Indutor da Apoptose (AIF) e a endonuclease G (endo G). Uma vez liberado, o citocromo C liga-se a Apaf-1 induzindo a formação de um complexo grande, conhecido como o apoptossomo, que recruta a caspase-9. No apoptossomo, a caspase-9 é ativada e clivada e irá ativar moléculas adicionais, como a caspase-3, desencadeando a apoptose (FAVALORO et al., 2012).

Figura 4 - Representação esquemática das principais vias moleculares que levam à apoptose.



Fonte: Adaptado de MACEDO; CARNEIRO; MATAYOSHI, 2007.

No que se refere a via degenerativa, a isquemia pode ser uma das principais causas da morte folicular (FARBER, 1982), causando alterações na permeabilidade da membrana celular, aumento de água intracelular, vacuolização citoplasmática e, conseqüentemente, degeneração (BARROS et al., 2001).

Apesar de ser um processo natural, diversos são os fatores que podem favorecer a ocorrência da atresia folicular. Entre eles, podem-se destacar: ligação de moléculas específicas a receptores de membrana (integrinas), radiação ionizante, agentes farmacológicos, danos no DNA, choque térmico, privação de fatores de crescimento e baixa quantidade de nutrientes. Estes fatores podem levar à ocorrência de estresse oxidativo na célula, através do aumento nos níveis de EROs ou diminuição na produção de enzimas antioxidantes, bem como alterações no metabolismo energético do oócito (KIM; LEE, 2000; YUCEBILGIN et al., 2004; WANG et al., 2015).

2.1.2.1. Estresse oxidativo e metabolismo energético folicular

O estado oxidativo e o metabolismo energético adequados são pré-requisitos para se evitar o processo de atresia e para que haja, assim, um desenvolvimento oocitário adequado. O desequilíbrio entre a geração de EROs e a capacidade dos sistemas de defesa antioxidantes para eliminá-las tem sido reconhecido como um fator de risco ao folículo. As EROs são formadas através de vazamento de elétrons da mitocôndria para membrana interna durante a fosforilação oxidativa e geração de ATP. Estes elétrons são transferidos para a molécula de oxigênio, resultando num elétron não emparelhado na órbita. Isto conduz à geração da molécula de superóxido (KOWALTOWSKI, 2004)

As EROs têm influência na expressão de vários genes envolvidos no metabolismo e em vias de transdução de sinais, agindo, portanto, como “moléculas sinalizadoras” ou “mensageiros secundários” (BARBOSA et al., 2014), estando envolvidas em funções fisiológicas fundamentais às células e ao próprio organismo (incluindo mecanismos de defesa celular). Por outro lado, as EROs, quando acumuladas, podem reagir com moléculas biológicas (BARBOSA et al., 2014) e funcionar como sinalizadoras e indutoras de processos que causam injúrias às células, como a peroxidação dos lipídios das membranas, danos ao DNA e morte celular por apoptose ou necrose. Os níveis intracelulares dessas substâncias é que vão determinar se a célula continua viva ou morre por apoptose ou necrose (LIMA-VERDE et al., 2007).

O estresse oxidativo pode levar a danos irreversíveis ao ovário. Consequências desse estresse podem provocar alterações negativas nos processos

de maturação e fecundação dos oócitos, bem como de cultivo dos prováveis embriões (ANDRADE et al., 2010). Em folículos, a falha dos mecanismos de defesa antioxidantes para neutralizar o estresse oxidativo permite que EROs alterem o estado redox celular (redução-oxidação), com a diminuição da capacidade antioxidante total (OYAWOYE et al., 2003), promovendo danos à célula, podendo culminar em morte.

Uma das organelas importante no processo de atresia folicular e na manutenção do estado energético adequado é a mitocôndria. Esta organela fornece ATP para célula por meio da oxidação fosforilativa. Durante esse processo, os elétrons de alta energia derivados da oxidação são carregados pelo NADH (dinucleotídeo de nicotinamida e adenina) + H e FADH₂ (dinucleotídeo de flavina e adenina) para membrana interna da mitocôndria através de uma cadeia transportadora de elétrons que converte elétron em ATP. Disfunções na mitocôndria já foram associadas à infertilidade (RAMALHO-SANTOS, 2009; SCHUBERT, 2015).

A mitocôndria também participa de vias apoptóticas, consumindo 85% do oxigênio da célula, o que faz dela a maior produtora de EROs. A produção excessiva de EROs pode causar dano ao DNA, oxidação de proteínas e lipídeos ou liberação do citocromo B no espaço extramitocondrial. Esta liberação no citoplasma desencadeia a ativação de uma série de enzimas proteolíticas, incluindo caspases-3, 6 e 7 que regulam a apoptose. Além disso, a GSH e outras enzimas antioxidantes, incluindo glutathione peroxidase 1 e 4 (GPX1 e GPX4), exercem importante função na manutenção do balanço redox da mitocôndria. Essas enzimas catalisam a redução de peróxido de hidrogênio e peróxido lipídico em água com o GSH atuando como doador de elétron (OTT et al., 2007). Durante o desenvolvimento do oócito, o número de mitocôndrias varia de aproximadamente 10 nas CGP pré-migratórias e atinge 200 na fase de oogônia. Oócitos primários contêm aproximadamente 6.000 mitocôndrias e durante a maturação citoplasmática o número aumenta para torno de 100.000 (CUMMINS, 2004).

As técnicas reprodutivas têm proporcionado grande auxílio na compreensão da fisiologia do desenvolvimento folicular, especialmente no que se refere aos processos de crescimento, estado metabólico, estresse oxidativo e atresia. Dentre essas técnicas, destaca-se a Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-Antrais (MOIFOPA).

2.1.3. Biotécnica de MOIFOPA

A MOIFOPA, também conhecida como “Ovário Artificial”, é uma biotécnica da reprodução que vem sendo aprimorada nos últimos tempos, auxiliando no desenvolvimento de pesquisas fundamentais e contribuindo para elucidação dos mecanismos envolvidos na foliculogênese inicial. Desta forma, a MOIFOPA tem como objetivos o resgate ou isolamento dos folículos pré-antrais a partir dos ovários antes que eles sofram o processo de atresia, conservar estes folículos visando à estocagem por um curto (resfriamento) ou longo (congelamento) período, cultivar os folículos pré-antrais e, conseqüentemente, os oócitos imaturos neles inclusos, até sua completa maturação, prevenindo-os da atresia, e proporcionar a produção de embriões em larga escala no futuro (FIGUEIREDO et al., 2008). Para alcançar tais objetivos, os mais variados sistemas e meios de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais de espécies mamíferas estão sendo desenvolvidos com o objetivo de reduzir a atresia e, conseqüentemente, aumentar a produção de oócitos maduros (FIGUEIREDO et al., 2011; FAUSTINO et al., 2011).

2.1.4. Cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

O cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma etapa de extrema importância da biotécnica MOIFOPA, pois a partir dessa etapa, pode-se produzir oócitos que poderão ser utilizados em outras biotécnicas, como a produção *in vitro* de embriões, transferência nuclear, produção de animais transgênicos, desenvolvimento de células-tronco embrionárias, dentre outras (FIGUEIREDO et al., 2009). Além disso, o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais é uma ferramenta que permite aperfeiçoar o conhecimento básico sobre os mecanismos envolvidos na foliculogênese ovariana (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010). Este sistema também é utilizado para estudar a importância de hormônios (ROCHA et al., 2013) e fatores de crescimento (SILVA et al., 2012), buscando o meio de cultivo ideal para o desenvolvimento folicular.

O folículo ovariano pode ser cultivado de duas maneiras: isolado ou incluso em tecido ovariano (FIGUEIREDO et al., 2011). O cultivo de folículos isolados, especificamente, permite o monitoramento individual do crescimento folicular, bem como verificar o efeito *in vitro* de diferentes substâncias sobre cada etapa do seu

desenvolvimento (ABIR et al., 2001). Este sistema pode ainda ser realizado de forma bidimensional (2D) (LORET DE MOTA et al., 2004; BARROS et al., 2013), na qual o folículo pode ser cultivado diretamente sobre uma superfície, ou em um sistema tridimensional (3D), quando o folículo é cultivado incluso numa matriz extracelular (ARAUJO et al., 2014). Recentemente, McLaughlin; Telfer (2010) combinaram um sistema de cultivo de dois passos, em que folículos primordiais bovinos foram cultivados até o estágio secundário inclusos em tecido ovariano (*in situ*) e, em seguida, foram isolados para posterior crescimento *in vitro*. Entretanto, estes autores não alcançaram estágio de embrião, necessitando, desta forma, de mais estudos para este tipo de cultivo.

Independente do sistema utilizado, ao longo dos anos, um notável progresso tem sido observado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em diferentes espécies animais. Nas espécies bovina (GUTIERREZ et al., 2000), canina (SERAFIM et al., 2010) e humana (TELFER et al., 2008), folículos pré-antrais isolados foram cultivados *in vitro* e se desenvolveram até o estágio antral. Em caprinos, a partir de folículos pré-antrais crescidos *in vitro*, obteve-se, pela primeira vez, a produção de um embrião até o estágio de mórula (MAGALHÃES et al., 2010). Além disso, em suínos (WU; TIANG, 2007), bubalinos (GUPTA et al., 2008) e ovinos (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO, 2010; LUZ et al., 2012), obteve-se a produção de embriões após maturação e fertilização *in vitro* de oócitos oriundos de folículos secundários crescidos *in vitro*. Em camundongos fêmeas, por sua vez, utilizando um sistema de cultivo em dois passos (cultivo de ovário inteiro seguido de cultivo de folículos secundários isolados), já foi relatado a produção de embriões e o nascimento de camundongos viáveis (59 crias) a partir oócitos de folículos primordiais cultivados *in vitro* (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003).

Embora importantes conquistas tenham sido obtidas, esta biotécnica ainda não tem aplicabilidade comercial, devido às condições de cultivo serem inadequadas, levando a produção de um número baixo e variável de embriões. Um fator que influencia significativamente o desenvolvimento folicular *in vitro* é a composição do meio de cultivo. Sabe-se que para o crescimento *in vitro* dos folículos, existem componentes fundamentais que devem estar presentes nos meios de cultivo, como nutrientes, eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos, vitaminas, hormônios e fatores de crescimento (PICTON et al., 2008).

2.1.4.1. Meios utilizados no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais

Diversos meios de cultivos comerciais já foram desenvolvidos para o cultivo de células. Dentre eles, pode-se destacar o α -MEM, que já foi utilizado em diferentes espécies, mantendo a viabilidade e promovendo o crescimento folicular (SILVA et al., 2010; BARROS et al., 2013). Xu et al. (2006) obtiveram prole fértil após um cultivo 3D de folículos secundários de murinos utilizando α -MEM. Este é um meio rico em substâncias, como eletrólitos, antioxidantes, aminoácidos, substratos energéticos e vitaminas (PICTON et al., 2008). Apesar disso, estudos vêm mostrando a necessidade de adicionar outros compostos ao meio de cultivo para um melhor desenvolvimento folicular.

Alguns estudos têm mostrado que a adição de antioxidantes, como o selenito de sódio, aumenta a taxa de crescimento *in vitro* e a maturação de folículos pré-antrais de murinos (ABEDELAKHI et al., 2008; 2010). Uhm et al. (2007) mostraram que o selênio, adicionado ao meio de cultivo, aumentou a taxa de formação de blastocistos e a expressão da glutathione peroxidase, diminuindo, conseqüentemente, a apoptose em embriões suínos. Além disso, a transferrina é relatada como uma importante substância a ser adicionada ao meio, pois alguns autores sugerem que o processo de maturação folicular está relacionado aos altos níveis de transferrina e seus receptores na célula (DEMESTERE et al., 2005). O ácido ascórbico também é um importante antioxidante utilizado no meio de cultivo *in vitro*. Trabalhos demonstram que esta substância promove a manutenção da viabilidade e o desenvolvimento folicular em caprinos (ROSSETTO et al., 2009; SILVA et al., 2011) e também, auxilia na ativação folicular em bovinos (ANDRADE et al., 2012). Além desses componentes antioxidantes, substratos energéticos como a glutamina e a hipoxantina, quando adicionados ao meio de cultivo de base, mantém a porcentagem de folículos morfológicamente normais durante o cultivo (FIGUEIREDO et al., 1994; SILVA et al., 2004). A insulina é adicionada ao meio de cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais como um fator de sobrevivência devido ao efeito sobre a proliferação e diferenciação de vários tipos de células (BOSSAERT et al. 2010).

Outros estudos testaram a adição de hormônios (ARUNAKUMARI et al., 2007; BARROS et al., 2013) e fatores de crescimento (TANG et al., 2012) ao meio de cultivo. Um hormônio que vem sendo amplamente estudado é o FSH, sendo testado isoladamente ou em associação com antioxidantes. Durante 14 dias de

cultivo *in situ* de folículos pré-antrais caprinos, a combinação de ácido ascórbico (50 mg/mL) e FSH (50 ng/mL) manteve a integridade ultra-estrutural e promoveu ativação e crescimento folicular (ROSSETTO et al., 2009). Barros et al. (2013) demonstraram que a adição de concentrações definidas de melatonina e/ou de FSH, adicionados ao meio base de forma sequencial, mantiveram a sobrevivência folicular e promoveram o crescimento do oócito após 12 dias de cultivo de folículos pré-antrais caprinos isolados. Outro estudo demonstrou que a associação entre FSH e Tiroxina no meio de cultivo de folículos pré-antrais isolados de ovelhas, seguido de maturação *in vitro*, aumentou as taxas de oócitos em estágio de metáfase II (ARUNAKUMARI et al., 2007).

Além desses suplementos que são utilizados com frequência no cultivo, outras substâncias já foram testadas, principalmente por conta de seu efeito antioxidante. A Coenzima Q₁₀, quando suplementada no meio de cultivo, aumentou a capacidade antioxidante total de folículos pré-antrais isolados de camundongos (KASHKA, ZAVAREH; LASHKARBOLUK, 2015). Outra substância foi o ácido alfa lipóico, que promoveu o desenvolvimento de folículos pré-antrais de camundongos cultivados *in situ* (TALEBI et al., 2012). Lima-Verde et al. (2009) demonstraram que o α -tocoferol e a ternatina promovem a ativação folicular após cultivo *in situ* de folículos pré-antrais caprinos.

Entretanto, é importante ressaltar que os meios de cultivo comerciais, tais como o α -MEM, possuem um custo elevado, encarecendo assim as pesquisas. Diante disso, o uso de meios alternativos, como extratos de plantas medicinais, pode ser uma estratégia promissora e de baixo custo para o cultivo de folículos ovarianos.

2.1.5. Uso terapêutico de plantas medicinais

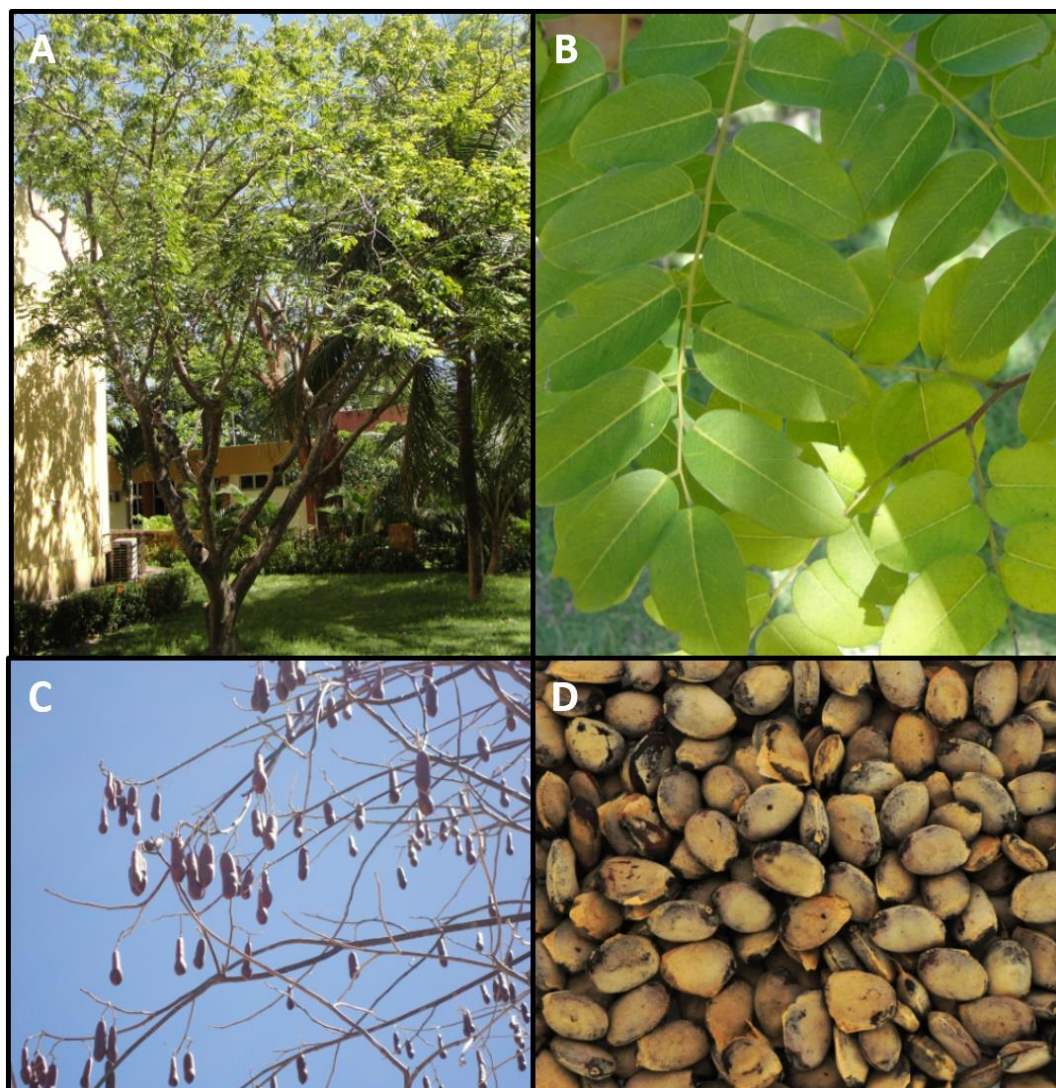
Vários estudos têm demonstrado que as populações locais da região do Semiárido Brasileiro possuem um vasto conhecimento sobre a utilidade medicinal de determinadas espécies de plantas, o que pode contribuir para a conservação da biodiversidade e sua função dentro do ecossistema. Além disso, o interesse popular no uso de plantas medicinais tem crescido consideravelmente, com consequente aumento dos estudos enfocando essas plantas na região do Semiárido Brasileiro. Entretanto, a maioria desses estudos é descritivo, sendo raros aqueles que realizam testes *in vitro* para avaliar o efeito de plantas medicinais (ALBUQUERQUE;

OLIVEIRA, 2007), o que seria de grande importância para aumentar o conhecimento sobre a biodiversidade e a necessidade de garantir o uso sustentável dos recursos naturais. Alguns autores observaram que dentre as cinco espécies nativas da caatinga consideradas mais importantes para indicações terapêuticas locais, a mais citada pelas comunidades foi a *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith (ALBUQUERQUE; OLIVEIRA, 2007; CARTAXO et al., 2010).

2.1.5.1. Uso e aplicações da *Amburana cearensis*

A *A. cearensis* (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae) é uma planta arbórea, popularmente conhecida no Nordeste Brasileiro como "Cumarú", "Amburana", "Amburana de cheiro", "Emburana de cheiro" ou "Umburana" (ALBUQUERQUE et al., 2007; LEAL et al., 2010; Figura 5). Esta espécie atinge altura de 4-10 m nas regiões de caatinga e é recomendada para trabalhos visando à recuperação de áreas degradadas (MAIA, 2004), sendo uma planta de grande importância econômica e social para as comunidades da região do Semiárido Brasileiro. A *A. cearensis* vem sendo largamente utilizada devido aos seus efeitos antibacteriano, antifúngico, antinociceptivo, antiinflamatório, broncodilatador, analgésico, antiespasmódico e antioxidante (ALBUQUERQUE et al., 2007; LEAL et al., 2010).

Figura 5 - Figura representativa da *Amburana cearensis* (A) e suas diferentes partes: folha (B), fruto (C) e semente (D).



Fonte: Adaptado de PEREIRA, 2011

Dentre os compostos identificados na casca e nas folhas da *A. cearensis*, podem-se destacar cumarinas, flavonóides (isocampferídeo, kampferol, afrormosina, 4'-metoxi-fisetina, quercetina e epicatequina), fenóis (ácido protocatecuico, ácido gálico e ácido p-cumárico) e glicosídeos (amburosídeos A e B) (BRAVO et al., 1999; CANUTO; SILVEIRA, 2006; GOUVEIA et al., 2015). Sabe-se que as cumarinas apresentam atividades antiinflamatória, analgésica, antimicrobiana, antitumoral, antimalárica, leishmanicida e antichagásica, além de não apresentarem toxicidade em doses usuais (HIGGINS et al., 1978; ADESINA, 1983; SILVEIRA; PESSOA, 2005). Gao et al. (2001) demonstraram que os flavonoides possuem atividade antioxidante mais potente do que a vitamina C (ácido ascórbico), vitamina E (α -

tecoferol) e β -caroteno. Além disso, os glicosídeos fenólicos (amburosídeos A e B) possuem atividade antioxidante, antiinflamatória e antimicrobiana. Já foi relatado que o amburosídeo A tem efeito neuroprotetor após o cultivo *in vitro* de células do mesencéfalo de ratas (LEAL et al., 2005) e ação sequestradora de EROs, observada pela redução da atividade da peroxidativa hepática, assim como pela restauração significativa da atividade da catalase (CAT), que estão amplamente relacionadas à sua propriedade antioxidante (LEAL et al., 2006). Além disso, o amburosídeo A não apresentou efeito citotóxico sobre o desenvolvimento de ovos de ouriço-do-mar (COSTA-LOTUFO et al., 2003).

Em estudo recente, demonstramos, por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE), substâncias com potencial antioxidante no extrato etanólico da *A. cearensis*, tais como ácido gálico, ácido protocatecuico, kampferol, ácido p-cumárico e epicatequina (GOUVEIA et al., 2015).

O ácido protocatecuico (PCA, ácido 3,4-diidroxibenzoico) é um polifenol natural e tem sido bastante estudado devido ao seu potencial antioxidante, neuroprotetor, cardioprotetor, antibacteriano, anticancerígeno, antidiabético, antiviral, analgésico, e anti-inflamatório (KAKKAR; BAIS, 2014). Um estudo demonstrou que a ação antioxidante *in vitro* do PCA, ocorre por meio da quelação de íons metálicos e eliminação de EROs (LI et al., 2011). Em ratos, o PCA promove a diferenciação, facilita a sobrevivência e reduz a apoptose de células neuronais cultivadas *in vitro* através da redução nos níveis de EROs e aumento a atividade da enzima CAT (GUAN et al., 2011). Além disso, o PCA mostrou efeito positivo sobre a proliferação *in vitro* de células nervosas de ratos (GUAN et al., 2009) e de condrócitos articulares de coelho (LUO et al., 2015). Estudos recentes demonstraram que o PCA atua como cardioprotetor ao reduzir a taxa de apoptose e inibir a expressão da caspase-3 ativada em cardiomiócitos de ratos *in vitro* (TANG et al., 2015).

O ácido gálico (AG; ácido 3,4,5-tri-hidroxibenzoico) é um composto fenólico (SINGH et al., 2004) e um antioxidante distribuído em plantas medicinais e alimentares (KIM, 2007; CHEN et al., 2009; PANICH et al., 2012). O AG apresenta atividade citoprotetora através do aumento dos níveis das enzimas antioxidantes (MANSOURI et al., 2013; FERK et al., 2011) ou pela redução nos níveis de EROs (FERK et al., 2011). Em ratos, por exemplo, o AG apresentou efeito neuroprotetor contra o estresse oxidativo induzido por 6-hidroxidopamina (MANSOURI et al., 2013). Além disso, este fenol reduziu o estresse oxidativo através do aumento nos

níveis de GSH, GPx, GSH-redutase e GSH-S-transferase em tecido hepático (CHEN et al., 2013).

O flavonoide kampferol é um polifenol antioxidante (CALDERON-MONTANO et al., 2011) abundantemente encontrado no chá, brócolis, maçãs, morangos e feijão (SOMERSET; JOHANNOT, 2008) e constitui uma parte significativa da dieta humana (WOJDYLO; OSZMIANSKI; CZEMERYS, 2007). Utilizando rato como modelo experimental, estudos já demonstraram que a ação antioxidante do kampferol se dá pela eliminação de EROs, preservação da atividade de várias enzimas antioxidantes, como CAT, GPx e GSH-S-transferase no tecido hepático (SHAKYA et al., 2013; RAJENDRAN et al., 2014), aumento da expressão da heme oxigenase-1 (HO-1) em células PC12 (células derivadas de um feocromocitoma da medula adrenal de ratos) (HONG et al., 2009) e neutralização das propriedades tóxicas de 7-beta-hidroxicolesterol em células de músculo liso e, conseqüente, redução da apoptose (RUIZ et al., 2006). Além disso, o kampferol apresentou efeito protetor contra a cardiotoxicidade induzida pela doxorubicina (DOX), aumentando a viabilidade celular e protegendo contra o estresse oxidativo (XIAO et al., 2012). Além do efeito antioxidante, o kampferol também tem demonstrado efeito antiinflamatório (HAMALAINEN et al., 2007; CRESPO et al., 2008), anti-hipertensivo (LOIZZO et al., 2007; OLSZANECKI et al., 2008) e anti-carcinogênico (ZHANG et al., 2008; KANG et al., 2010; MYLONIS et al., 2010).

O ácido p-cumárico é um ácido fenólico, amplamente existente em frutas, como maçãs e peras, e vegetais e seus produtos, como feijões, batatas, tomate e chá (ZANG et al., 2000). O ácido p-cumárico é um antioxidante mais ativo do que os derivados do ácido benzóico, tais como PCA, siríngico e vanílico (BALASUNDRAM et al., 2006). Isso se deve à dupla ligação presente na molécula dos derivados do ácido cinâmico, que participa da estabilidade do radical por ressonância de deslocamento do elétron desemparelhado (WANASUNDARA et al., 1994). Abdel-Wahab et al. (2003) mostraram que o ácido p-cumárico protege animais contra danos oxidativos cardíacos induzidos pela DOX, por meio do sequestro de EROs. Zang et al. (2000), demonstraram que o ácido p-cumárico reduz a peroxidação lipídica e diminui o colesterol LDL em ratas.

O flavonóide epicatequina, componente importante do cacau e chocolate escuro, é um antioxidante conhecido por estar associado com menor risco de acidente vascular cerebral e insuficiência cardíaca (ENGLER; ENGLER, 2006;

STEFFEN et al., 2006; RAMIRO-PUIGCASTELL, 2009;). Panneerselvam et al. (2010) mostraram que a epicatequina pode levar à proteção cardíaca via estimulação de receptores opioides e ativação de vias anti-apoptóticas, definindo, assim, um mecanismo mediado por receptores de epicatequina. Um estudo demonstrou que a epicatequina tem efeito protetor contra nefropatia induzida por cisplatina em ratos, mesmo se o tratamento for iniciado após a injúria da cisplatina já ter atingido células tubulares, sugerindo mecanismo de proteção mitocondrial (TANABE et al., 2012). Além disso, a epicatequina, encontrada no chá verde, impediu ototoxicidade e alterações de membrana mitocondrial mediada por EROs induzidos por tratamento com cisplatina (KIM et al., 2008). Outros estudos também demonstraram que a epicatequina diminui os danos no DNA (NAIR et al., 2008; PYUN et al., 2011) e protege os fibroblastos humanos no cultivo primário *in vitro* contra radiação ionizante, bloqueando geração de EROs e inibindo Mitogen-activated protein kinases (MAPKs) (SHIN et al., 2014).

Estudos recentes realizados por nossa equipe mostraram que o extrato da *A. cearensis*, na concentração de 0,2 mg/mL, mantém a percentagem de folículos pré-antrais caprinos morfológicamente normais e baixas taxas de apoptose de forma semelhante ao meio comercial (MEM), após 6 horas de conservação a 4°C (Gouveia et al., 2015). Em outro estudo, o extrato da *A. cearensis*, utilizado como meio de cultivo, na concentração de 0,1 mg/mL, sem adição de suplementos, manteve a sobrevivência e promoveu maior desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários ovinos isolados ao longo de 18 dias de cultivo, comparado ao meio controle (α -MEM⁺) (Barberino et al., 2015). Mesmo alguns trabalhos mostrando o potencial do extrato da *A. cearensis* na reprodução, ainda não existe nenhum trabalho demonstrando o efeito do extrato da *A. cearensis* sobre o desenvolvimento de folículos secundários caprinos cultivados isoladamente *in vitro*. Além disso, não existem trabalhos que mostrem a interação da *A. cearensis* com suplementos rotineiramente utilizados em pesquisas, em associação ou não com o FSH, sobre o cultivo folicular.

2.1.6. Técnicas utilizadas para avaliação da qualidade folicular durante e após o cultivo *in vitro*

O cultivo *in vitro*, por si só, já é uma técnica eficaz para avaliar a morfologia e desenvolvimento folicular, visto que a progressão de um folículo para qualquer que seja o estágio mais avançado que o seu estágio inicial só é possível *in vitro* se o mesmo estiver primeiramente íntegro e também tendo suporte (utilização de meios de cultivo, umidade, temperatura, etc.) adequado para o seu desenvolvimento. No entanto, diferentes técnicas podem auxiliar a análise folicular antes, durante e após o cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais. A mais utilizada e simples técnica é a utilização de um estereomicroscópio para a análise subjetiva da morfologia, avaliando parâmetros como normalidade, aumento do diâmetro e formação de antro (BARROS et al., 2013; BARBERINO et al., 2015).

Existem outras técnicas mais avançadas de avaliação que vêm sendo utilizadas, dentre elas, destaca-se a microscopia de fluorescência, que utiliza marcadores fluorescentes que, quando excitados com radiação de baixo comprimento de onda, absorvem energia e emitem luz de comprimento de onda maior (JUNQUEIRA; CARNEIRO, 2004). A microscopia de fluorescência é considerada uma técnica confiável, prática e rápida para analisar a viabilidade folicular (LOPES et al., 2009), bem como seu estado oxidativo e energético (SILVA et al., 2015). Estes podem ser determinados através da avaliação da expressão dos níveis intracelulares de EROs, GSH e atividade mitocondrial. Para isso, são utilizados marcadores fluorescentes como 2', 7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína (H₂DCFDA), 4-clorometil-6.8-difluoro-7-hidroxycumarina (CellTracker® Blue) e Mitotracker® Red, respectivamente.

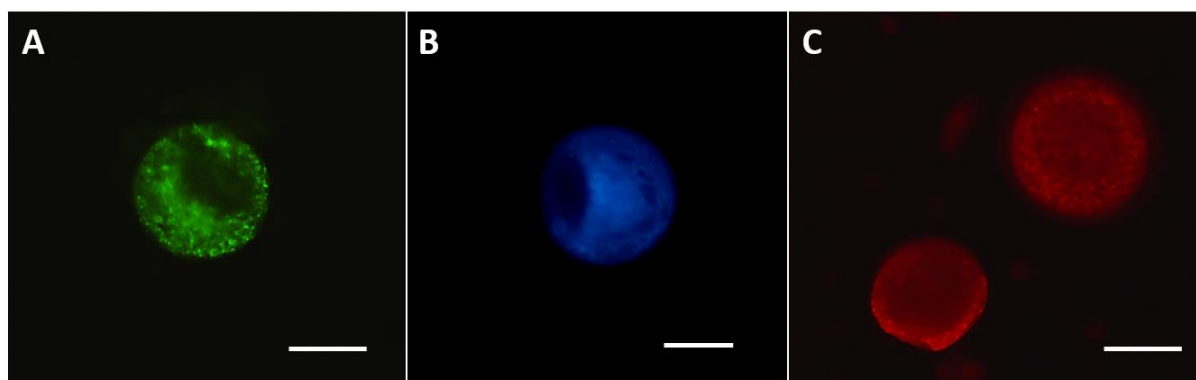
O H₂DCFDA tem sido utilizado para a quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na célula por meio do processo da oxidação de dichlorofluoresceína 2'-7' (H₂DCF) à 2'-7'dichlorofluoresceína (DCF) e a forma diacetato, H₂DCFDA e seu éster acetometil H₂DCFDA-AM são absorvidos pelas células, onde esterases celulares não específicas atuam sobre ela para clivar os grupos lipofílicos, resultando em um composto carregado, o qual é retido no interior da célula. A oxidação de H₂DCF por EROs converte a molécula de DCF, que é altamente fluorescente (HELD, 2015). O resultado dessa reação faz com que seja observado uma fluorescência verde, de diferentes intensidades, devido a diferentes quantidades da EROs (Figura 5A).

O CellTracker® Blue, por sua vez, passa livremente através das membranas celulares. Uma vez dentro da célula, são transformados em produtos de reação de

células-impermeabilizantes. As sondas de fluorescência CellTracker contêm um grupo clorometilo ou bromometilo, que reage com grupos tiol, utilizando uma reação de GSH-S-transferase-mediada. Na maioria das células, os níveis de GSH são elevados (até 10 mM) e GSH-transferase é sempre presente. Essa reação irá ser observada através de uma fluorescência azul (Figura 5B). O Mitotracker® Red, por sua vez, atravessa a membrana celular e se acumula nas mitocôndrias com potencial de membrana ativa, sendo observada, após reação, uma fluorescência vermelha (MACEDO, 2015; Figura 5C).

Para fazer a quantificação da intensidade da fluorescência emitida pelos oócitos após a utilização deste marcadores, as imagens são avaliadas no software ImageJ (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA), que quantifica os pixels gerados em cada imagem, em cada oócito.

Figura 6 - Imagens fluorescentes para H₂DCFDA (A), CellTracker® Blue (B) e Mitotracker® Red (C). Barra de escala: 60 µm.

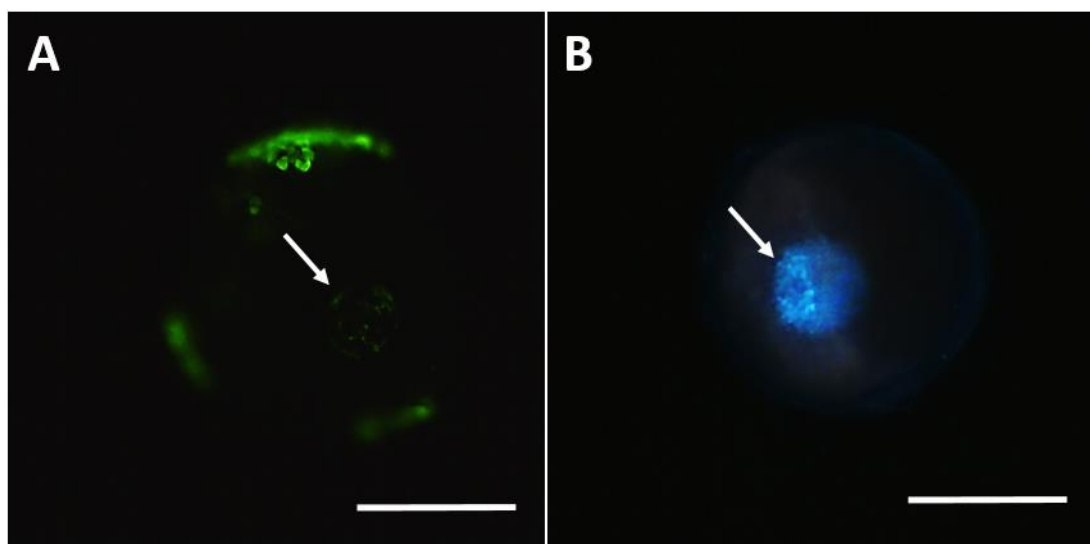


Fonte: Arquivo pessoal.

Além dos marcadores indicativos do estado oxidativo e energético do folículo, através da microscopia de fluorescência, pode-se verificar também danos no DNA (fragmentação do DNA) característicos do processo de apoptose. Isso é possível através do ensaio de TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling). Nesta análise, o grupo 3'-OH do DNA fragmentado é marcado com FITC pela enzima deoxinucleotídeo transferase (Tdt), a qual catalisa a polimerização de nucleotídeos modificados no terminal 3'-OH (LIMA, 2012; Figura 6A). Concomitante à avaliação da apoptose por TUNEL, pode-se utilizar também o corante fluorescente Hoescht 33342, que penetra em células vivas e tem sido

largamente empregado em citologia com a finalidade de corar cromossomos (MATOS et al., 2007b; Figura 6B).

Figura 7 – Imagens fluorescentes demonstrando oócito com marcação para TUNEL (A) e Hoescht 33342 (B). Setas indicam a marcação fluorescente na cromatina. Barra de escala: 60 μ m.



Fonte: Arquivo pessoal.

Diante do exposto, percebe-se a importância das técnicas para avaliação da qualidade folicular para a melhoria dos sistemas de cultivo *in vitro*. Além disso, como pode ser observado na revisão de literatura acima, apesar de ser uma planta de grande importância para as comunidades da região do Semiárido Brasileiro, e apresentar diversos compostos com propriedades antioxidantes, o efeito do extrato de *A. cearensis* sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados ainda não é conhecido.

2.2. JUSTIFICATIVA

O Vale do São Francisco, com destaque para o Estado de Pernambuco, apresenta-se como uma região atrativa para se desenvolver a cadeia produtiva da caprinocultura. A criação de caprinos, animais adaptados à região, é explorada como fonte de renda (fonte de carne, pele e leite), contribuindo, especialmente, para o desenvolvimento sócio-econômico de pequenos produtores rurais no Semiárido Nordeste. Uma das formas de promover a sustentabilidade e o desenvolvimento dos pequenos produtores locais de caprinocultura é viabilizando pesquisas para o aprimoramento de biotécnicas reprodutivas que poderiam aumentar a produtividade dos rebanhos caprinos e, conseqüentemente, proporcionar mais lucro aos produtores. Dentre essas biotécnicas, destaca-se a MOIFOPA que permite a recuperação de milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário, evitando a grande perda folicular que ocorre normalmente *in vivo*. Sendo assim, os oócitos oriundos de folículos pré-antrais crescidos *in vitro* poderão ser utilizados para maturação e fertilização *in vitro*, transferência de embriões e/ou criopreservação.

Mesmo com a possibilidade de recuperar milhares de folículos pré-antrais a partir de um único ovário, para alcançar o sucesso da MOIFOPA, especialmente no que se refere à eficiência do cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais e da maturação oocitária, importante atenção deve ser dada ao meio utilizado. Sabe-se que o Brasil possui uma grande dependência de insumos externos, como por exemplo, os meios de cultivo corriqueiramente empregados, como o α -MEM, o que torna as técnicas bem mais onerosas. Desta forma, uma alternativa à utilização desses meios importados seria o emprego de produtos naturais, como o extrato da *A. cearensis*, produto típico do bioma Caatinga, que tem recebido notória atenção por suas numerosas características citoprotetoras e antioxidantes, agindo na prevenção ou redução dos danos induzidos pelas espécies reativas de oxigênio em diferentes tipos celulares. Entretanto, o efeito do extrato de *A. cearensis* sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados ainda não foi elucidado. Além disso, faz-se necessário verificar se a adição de suplementos e/ou FSH ao extrato da planta influenciaria positivamente o crescimento folicular *in vitro*. Neste caso, para avaliar os efeitos antioxidantes do referido extrato, é de extrema importância avaliar o estado oxidativo, a atividade mitocondrial e as taxas de apoptose nos folículos ovarianos após o cultivo.

2.3. OBJETIVOS

2.3.1. Objetivo geral:

Estudar o efeito do extrato de *Amburana cearensis* no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais caprinos isolados.

2.3.2. Objetivos específicos:

Verificar o efeito de diferentes concentrações (0,1; 0,2 ou 0,4 mg/mL) do extrato de *Amburana cearensis* sobre a morfologia, a formação de antro e o crescimento de folículos pré-antrais caprinos isolados ao longo de 12 dias de cultivo *in vitro*;

Avaliar as taxas de apoptose, os níveis intracelulares de GSH e a atividade mitocondrial de folículos secundários caprinos após cultivos *in vitro* em extrato de *Amburana cearensis*, na ausência ou presença de suplementos e/ou FSH.

2.4. CAPÍTULO 1

Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves *in vitro* development of isolated goat preantral follicles

(Meio de base suplementado contendo *Amburana cearensis* associado com FSH melhora o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de cabras isolados)

B. B. Gouveia¹, T. J. S. Macedo¹, J. M. S. Santos¹, R. S. Barberino¹, V. G. Menezes¹,
M. C. Müller¹, J. R. G. S. Almeida², J. R. Figueiredo³, M. H. T. Matos^{1*}

¹Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil; ²Center for Studies and Research on Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, 56304-205, Petrolina-PE, Brazil; ³Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

Submetido para publicação no periódico **Theriogenology** (Anexo 1)
(Qualis A2 na área de Medicina Veterinária)

Meio de base suplementado contendo *Amburana cearensis* associado com FSH melhora o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais de cabras isolados

B. B. Gouveia¹, T. J. S. Macedo¹, J. M. S. Santos¹, R. S. Barberino¹, V. G. Menezes¹, M. C. Müller¹, J. R. G. S. Almeida², J. R. Figueiredo³, M. H. T. Matos^{1*}

¹Núcleo de Biotecnologia Aplicada ao Desenvolvimento de Folículos Ovarianos, Universidade Federal do Vale São Francisco, 56300-990, Petrolina-PE, Brasil; ² Centro de Estudos e Pesquisa em Plantas Mediciniais, Universidade Federal do Vale São Francisco, 56304-205, Petrolina-PE, Brasil; ³ Laboratório de Manipulação de Oócitos e Folículos Pré-Antrais, Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza-CE, Brasil.

A correspondência deve ser endereçada a:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Colegiado de Medicina Veterinária - Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia. Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1. CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil. Tel.: +55.87.2101.4839.

Autor para correspondência: helena.matos@univasf.edu.br (M. H. T. Matos)

Resumo

Os efeitos do extrato etanólico de *Amburana cearensis*, com ou sem a adição de um mix de suplementos associados ou não com FSH, sobre a morfologia e desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários caprinos foram avaliados. No experimento 1, folículos isolados (250 μm de diâmetro) foram cultivados durante 12 dias em α -MEM sozinho (controle) ou em meio composto por diferentes concentrações do extrato de *A. cearensis* (Amb 0,1; 0,2 ou 0,4 mg/mL). No experimento 2, os meios de cultivo foram α -MEM ou Amb 0,2 mg/mL (ambos sem suplementos) ou estes mesmos meios suplementados com BSA, insulina, transferrina, selênio, glutamina, hipoxantina e ácido ascórbico (denominados como α -MEM⁺ e Amb 0,2⁺ mg/mL, respectivamente), ou estes últimos grupos também suplementados com FSH sequencial (100 ng/mL do dia 0 ao dia 6; 500 ng/mL do dia 6 ao dia 12), constituindo os grupos α -MEM⁺ + FSH e Amb 0,2⁺ + FSH. No final do cultivo no experimento 1, o meio controle (α -MEM) e Amb 0,2 mg/mL possuem percentagens mais elevadas ($P < 0,05$) de folículos morfologicamente normais e de oócitos completamente crescidos, ou seja, oócito com diâmetro $> 110 \mu\text{m}$, comparados às outras concentrações do extrato de *A. cearensis*. No experimento 2, todos os meios suplementados apresentaram maior percentagem ($P < 0,05$) de folículos normais e formação de antro do que os meios não suplementados. Além disso, folículos cultivados em Amb 0,2⁺ mg/mL + FSH mostraram um aumento médio no diâmetro maior ($P < 0,05$) do que os outros tratamentos. Oócitos cultivados em ambos os tratamentos suplementados com FSH apresentaram níveis mais elevados ($P < 0,05$) de GSH e mitocôndrias ativas do que os meios não suplementados, porém semelhantes aos demais tratamentos ($P > 0,05$). Em conclusão, o extrato de *A. cearensis* (0,2 mg/mL) adicionado de suplementos e FSH melhora o crescimento folicular. Portanto, ele pode ser um meio de cultivo alternativo para o desenvolvimento de folículos pré-antrais de cabras.

Palavras-chaves: Oócitos, Antioxidante, Planta Medicinal, GSH, Mitocôndria

Introdução

Sistemas de cultivo *in vitro* de folículos ovarianos podem ser usados para produzir oócitos maduros e, subsequentemente, embriões (TAGLER et al., 2013). O cultivo folicular é extremamente bem sucedido em murinos, demonstrado pela produção de descendentes vivos (O'BRIEN; PENDOLA; EPPIG, 2003), mas ainda não foi adaptado com sucesso para humanos (TELFER et al., 2008) e outras espécies (ARUNAKUMARI; SHANMUGASUNDARAM; RAO et al., 2010; MAGALHÃES et al., 2011). Um dos principais obstáculos é a otimização da composição do meio de cultivo para pequenos folículos.

O Meio Essencial Mínimo-alfa modificado (α -MEM) tem sido o meio mais comumente utilizado no cultivo de oócitos e células foliculares em caprinos (BARROS et al., 2013) e ovinos (ESMAIELZADEH et al., 2010). A adição de suplementos (substratos energéticos, antioxidantes, hormônios e/ou fatores de crescimento) ao α -MEM é necessária para garantir taxas aceitáveis de viabilidade e crescimento folicular (ABEDELAKHI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010; SANTOS et al., 2014). Entre os suplementos, o Hormônio Folículo Estimulante (FSH) tem sido amplamente utilizado no cultivo *in vitro* de folículos pré-antrais em várias espécies, mantendo a viabilidade, reduzindo a apoptose e promovendo o crescimento folicular (GUTIERREZ et al., 2000; SARAIVA et al., 2010; BARROS et al., 2013).

Numa tentativa de reduzir os custos dos meios de cultivo, uma estratégia alternativa potencial para a otimização do desenvolvimento folicular *in vitro* é a utilização de extratos de plantas medicinais. *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae) é uma árvore comumente encontrada na região do Nordeste do Brasil, onde é conhecida popularmente como "cumaru" (DANTAS et al., 2015), "amburana" ou "amburana-de-cheiro" (LEAL et al., 2010). Na medicina popular, extratos desta planta tem sido utilizados para o tratamento de uma ampla variedade de doenças, incluindo problemas respiratórios, gripe, tosse, trombose, hipertensão, inflamação e cicatrização (CARTAXO et al., 2010). Em um estudo recente realizado pelo nossa equipe, o extrato etanólico de *A. cearensis* foi utilizado com sucesso para preservar tecido ovariano caprino a 4°C, durante 6 h, mantendo as percentagens de folículos normais e apoptóticos semelhantes às observadas no meio controle (MEM) (GOUVEIA et al., 2015). Além disso, o extrato etanólico de *A. cearensis* pode ser utilizado como meio de cultivo para folículos pré-antrais ovinos, mantendo a

sobrevivência e estimulando maior crescimento de folículos secundários isolados do que o meio controle (α -MEM⁺) (BARBERINO et al., 2015). Ambos os estudos utilizaram o mesmo extrato de *A. cearensis*, no qual foram identificados os seguintes compostos: ácido gálico, ácido protocatecuico, epicatequina, ácido p-cumárico e kampferol (GOUVEIA et al., 2015). Estes compostos podem atuar como antioxidantes naturais, reduzindo os níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) e danos no DNA, modulando a expressão de enzimas antioxidantes, como a glutathiona (GSH), e melhorando a função mitocondrial em diferentes tipos de células (LEAL et al., 2005; RUIJTERS et al., 2013; KIM et al., 2014; SILVA et al., 2015).

Como os cultivos *in vitro* de oócitos são mantidos em atmosfera de oxigênio mais elevada do que o ambiente *in vivo*, levando a um aumento do nível de EROs (WANH et al., 2007), pode-se especular que os antioxidantes naturais da *A. cearensis* protegeriam os folículos ovarianos do dano oxidativo durante o cultivo *in vitro*. Assim, o extrato de *A. cearensis* pode ser um substituto útil e mais barato ao meio de cultivo celular padrão. No entanto, não há relatos em que este extrato tenha sido utilizado como meio de cultivo para folículos ovarianos de cabras. Assim, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do extrato etanólico de *A. cearensis* sobre a morfologia e desenvolvimento *in vitro* de folículos secundários caprinos isolados. Além disso, estudamos se a adição de suplementos comumente utilizados (albumina sérica bovina - BSA, insulina, transferrina, selênio, glutamina, hipoxantina e ácido ascórbico), na ausência ou presença de FSH, ao extrato de *A. cearensis* influenciaria o desenvolvimento, apoptose, níveis intracelulares de GSH e a presença de mitocôndrias metabolicamente ativas (indicativo de células intactas - VAN DEN HURK et al., 1998) de folículos caprinos.

Materiais e Métodos

A menos que indicado, suplementos, hormônio e produtos químicos utilizados no presente estudo foram adquiridos da Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA).

Material vegetal e preparação do extrato

Folhas frescas de *A. cearensis* foram coletadas em Petrolina (09°23'55" ao Sul e 38-40°30'03" ao Oeste, Pernambuco, Brasil), pertencente ao bioma Caatinga,

caracterizado por um clima semiárido, com temperatura média anual de 26,4°C. Um espécime registrada (5545) está depositada no Herbário Vale do São Francisco (HVASF) da Universidade Federal do Vale São Francisco. As folhas foram secas em estufa à 40°C, pulverizadas e extraídas à temperatura ambiente com etanol 95% (Vetec, Duque de Caxias-RJ, Brasil) durante 72 h. O extrato foi seco à 45°C utilizando um rotavapor e o rendimento foi de aproximadamente 10%, obtendo-se o extrato etanólico das folhas de *A. cearensis*, que foi dissolvido em solução salina a 0,9%, correspondendo às concentrações de 0,1; 0,2 ou 0,4 mg/mL (GOUVEIA et al., 2015).

Origem do tecido ovariano

Ovários (n = 130) foram coletados em matadouro local a partir de 65 cabras (*Capra hircus*) adultas (1-3 anos de idade) e mestiças. Imediatamente após abate do animal, os pares de ovários foram lavados uma vez em álcool 70% e, em seguida, duas vezes em Meio Essencial Mínimo tamponado com HEPES (MEM-HEPES) e suplementado com antibióticos (100 µg/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina). Em seguida, os ovários foram transportados, em um período de 1 h, ao laboratório em tubos contendo MEM-HEPES com antibióticos a 4°C (CHAVES et al., 2008).

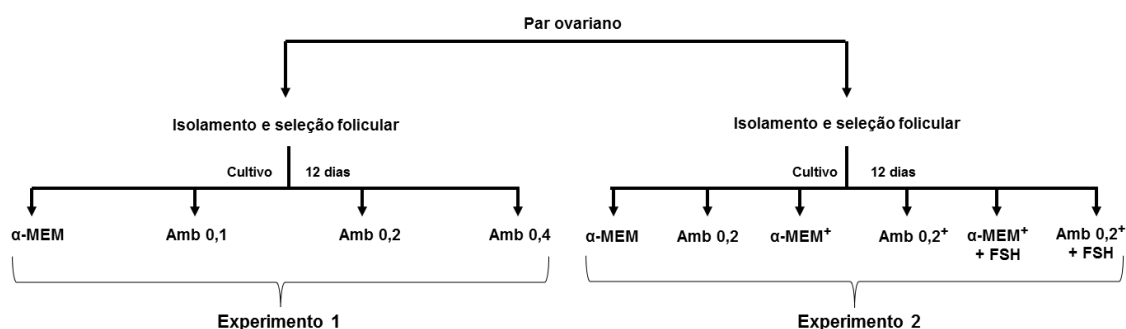
Isolamento, seleção e cultivo in vitro de folículo secundários caprinos

No laboratório, o tecido adiposo circundante e ligamentos foram retirados dos ovários; grandes folículos antrais e corpos lúteos foram removidos. Fragmentos do córtex ovariano (1-2 mm de espessura) foram removidos a partir da superfície do ovário utilizando uma lâmina cirúrgica, sob condições estéreis e, em seguida, colocados em meio que consistia em MEM-HEPES com antibióticos. Folículos secundários de cabras, com cerca de 250 µm de diâmetro, sem cavidades antrais, foram visualizados sob um estereomicroscópio (SMZ645 Nikon, Tóquio, Japão) e mecanicamente isolados por microdissecação, utilizando agulhas de calibre 26 (26 G). Estes folículos foram então transferidos para gotas de 100 µL de meio de cultivo de base para a avaliação da qualidade. Somente folículos que apresentavam as seguintes características foram selecionados para o cultivo: uma membrana basal

intacta, duas ou mais camadas de células da granulosa e um oócito visível e saudável, e centralmente localizado dentro do folículo, sem qualquer escurecimento do citoplasma. Os folículos isolados foram reunidos e em seguida distribuídos aleatoriamente entre os grupos de tratamento, com aproximadamente 45-50 folículos por grupo, dependendo do experimento.

Após a seleção, os folículos foram cultivados individualmente (um folículo por gota) em gotas de 100 μ L de meio de cultivo sob óleo mineral em placas de Petri (60 x 15 mm; Corning, Sarstedt, Newton, NC, EUA). A incubação foi conduzida a 39°C e 5% de CO₂ em ar durante 12 dias. Este trabalho foi dividido em dois experimentos que ocorreram em tempos diferentes, como mostrado na Figura 1.

Figura 1 - Protocolo experimental geral para o cultivo *in vitro* de folículos secundários caprinos em diferentes meios.



Experimento 1

O meio controle de base consistiu de α -MEM (pH 7,2-7,4) sem suplementos. Para avaliar a influência da planta, os folículos (aproximadamente, 45 folículos por grupo de tratamento) foram distribuídos aleatoriamente em α -MEM (meio controle) ou em meio composto por diferentes concentrações de extrato de *A. cearensis* (Amb 0,1; 0,2 ou 0,4 mg/mL; pH 7,2-7,4). Em todos os tratamentos, 60 μ L do meio de cultivo foi substituído por meio fresco em cada gota a cada 2 dias.

Os aspectos morfológicos de todos os folículos pré-antrais foram avaliados a cada 6 dias utilizando uma ocular micrométrica pré-calibrada acoplada em um estereomicroscópio (SMZ 645 Nikon) com aumento de 100x. Apenas os folículos que apresentava, uma membrana basal intacta, com células da granulosa brilhantes

e homogêneas e a ausência de sinais morfológicos de degeneração foram classificados como folículos morfolologicamente normais. A atresia folicular foi determinada quando observou-se escurecimento do oócito e células do cumulus circundantes, oócitos disformes ou diminuição do diâmetro folicular. A ruptura da membrana basal também foi observada e caracterizada como extrusão do oócito. As seguintes características foram analisadas nos folículos morfolologicamente normais: (i) formação de cavidade antral, definida como o surgimento de uma cavidade translúcida visível entre as camadas de células da granulosa, (ii) diâmetro dos folículos normais, mensurados a partir da membrana basal, que incluiu duas medidas perpendiculares de cada folículo, (iii) aumento no diâmetro, e (iv) taxa de crescimento diário, calculada como o diâmetro de folículos normais no dia 12 menos o diâmetro dos folículos no dia 0, dividido pelos dias de cultivo *in vitro* (12 dias).

Após 12 dias de cultivo, todos os folículos normais foram cuidadosamente e mecanicamente rompidos com agulhas 26 G sob estereomicroscópio para recuperação de oócitos. A percentagem de oócitos completamente crescidos, ou seja, oócitos com diâmetro $>110 \mu\text{m}$, foi calculada como o número de oócitos de qualidade aceitável ($\geq 110 \mu\text{m}$) recuperados pelo número total de folículos cultivados ($\times 100$).

Experimento 2

Para avaliar a eficácia da adição de suplementos ao meio de cultivo, folículos secundários (aproximadamente 50 folículos por grupo de tratamento) foram distribuídos aleatoriamente nos seguintes tratamentos: α -MEM (meio de controle) e Amb 0,2 mg/mL (melhores resultados obtidos no primeiro experimento), ambos sem suplementos, ou estes mesmos meios suplementados com 3,0 mg/mL de albumina sérica bovina (BSA), 10 ng/mL de insulina, 5,5 $\mu\text{g/mL}$ de transferrina, 5,0 ng/mL de selênio, 2 mM glutamina, 2 mM hipoxantina e 50 $\mu\text{g/mL}$ de ácido ascórbico. Estes meios foram denominados como α -MEM⁺ e Amb 0,2⁺, respectivamente. Além disso, estes últimos grupos foram ainda suplementados com FSH recombinante humano (Gonal-F®; Serono Laboratórios, São Paulo, Brasil) em concentrações crescentes (FSH sequencial: do dia 0 ao dia 6 = 100 ng/mL; do dia 6 ao dia 12 = 500 ng/mL, de acordo com Barros et al., 2013), constituindo os grupos α -MEM⁺ + FSH e Amb 0,2⁺ + FSH. A cada dois dias, 60 μL do meio de cultivo de cada gota foi substituído por

meio fresco. Em todos os tratamentos com FSH, uma mudança completa do volume (100 μ L) do meio foi realizada a cada 6 dias.

Conforme descrito para o experimento 1, a cada 6 dias de cultivo, os folículos foram avaliados quanto aos aspectos morfológicos (folículos morfológicamente normais, extrusão do oócito, formação de cavidade antral, diâmetro, aumento no diâmetro, taxa de crescimento diário e percentagem de oócitos totalmente crescidos). Além disso, os oócitos normais recuperados no experimento 2 foram avaliados quanto às taxas de apoptose, níveis intracelulares de GSH e atividade mitocondrial.

Detecção de células apoptóticas pela análise de TUNEL

Para avaliar a fragmentação do DNA e a apoptose, no final do cultivo, os oócitos foram submetidos ao ensaio de TUNEL, como previamente descrito (Li et al., 2009). Resumidamente, os oócitos foram fixados em solução de paraformaldeído a 4% durante 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, os oócitos (aproximadamente, 10 oócitos por grupo de tratamento) foram lavados três vezes em solução de PBS/PVP e armazenados a 4°C em eppendorf com PBS/PVP até o início do procedimento de TUNEL. Para tanto, os oócitos foram incubados em gotas de 100 μ L de solução permeabilizante [0,1% (v / v) de Triton X-100 em 10 mM de PBS] durante 3 h à temperatura ambiente. Os controles positivos e negativos foram incubados em gotas de 100 μ L contendo solução de DNase livre RNase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, EUA) a 37°C durante 1 h e lavados 3 vezes em gotas de PBS/PVP. A análise de TUNEL foi preparada como indicado pelo fabricante (In Situ Cell Detection Kit, Fluorescein: Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics Ltd., Indianapolis, EUA). Para este fim, 12,5 μ L de enzima DTT e 112,5 μ L de solução marcadora contendo trifosfato de 2-desoxiuridina de 5-FITC (FITC-dUTP) foram utilizadas para se obter 125 μ L de solução para reação de TUNEL. Os grupos experimentais e o controle positivo foram incubados com 15 μ L desta solução durante 1 h a 37°C numa câmara úmida, no escuro. O controle negativo foi incubado com 15 μ L da solução marcadora (FITC-dUTP). Os oócitos foram lavados 3 vezes em gotas de PBS/PVP e incubados em gotas de PBS contendo 10 mM de Hoechst 33342 durante 15 minutos à temperatura ambiente, no escuro. Em seguida, os oócitos foram lavados em gotas de PBS/PVP e as lâminas foram preparadas para

avaliação usando um microscópio de epifluorescência (Nikon E200, Tóquio, Japão) com uma ampliação de 400x. Os oócitos foram considerados apoptóticos quando sua cromatina apresentava-se marcada com fluorescência verde.

Mensuração dos níveis intracelulares de GSH e de mitocôndrias metabolicamente ativas

Após o cultivo, os oócitos foram recuperados e os níveis intracelulares de GSH e a atividade mitocondrial foram mensurados como descrito anteriormente (KWAK et al., 2012; TANABE et al., 2015), com pequenas modificações. Resumidamente, 4-clorometil-6,8-difluoro-7-hidroxicumarina (Invitrogen CellTracker® Blue; CMF₂HC) e MitoTracker® Red (MitoTracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) foram usados para detectar níveis intracelulares de GSH e atividade mitocondrial, como fluorescência azul e vermelha, respectivamente. Oócitos (aproximadamente, 10 oócitos por grupo de tratamento) foram incubados (no escuro) durante 30 minutos em PBS e 10 mM de CellTracker Blue e 100 nM de MitoTracker Red a 37°C. Após a incubação, os oócitos foram lavados com PBS e a fluorescência foi observada sob um microscópio de epifluorescência, com filtros UV (370 nm para GSH e 579-599 nm para a mitocôndria ativa). Imagens fluorescentes foram salvas em formato de imagem TIFF e as intensidades da fluorescência dos oócitos foram analisadas usando o software Image J. (National Institutes of Health, Bethesda, MD, EUA).

Análise estatística

Os dados de sobrevivência folicular, folículos extrusos, formação de antro e recuperação de oócitos após o cultivo *in vitro* foram expressos em percentagem e comparados pelo teste do Qui-quadrado. Dados para GSH, atividade mitocondrial, diâmetro folicular, aumento no diâmetro e taxa de crescimento foram submetidos ao teste de Shapiro-Wilk para verificar a distribuição normal dos resíduos e homogeneidade das variâncias. Em seguida, foi utilizado o teste não-paramétrico Kruskal-Wallis para as comparações. Quando os efeitos principais ou interações foram significativos, as médias foram comparadas pelo teste de Student Newman Keuls. Os dados de células apoptóticas (TUNEL) foram submetidos ao teste PLSD

Fisher e expressos em percentagem. Os resultados foram expressos como a média \pm erro padrão da média (e.p.) e as diferenças foram consideradas significativas quando $P < 0,05$.

Resultados

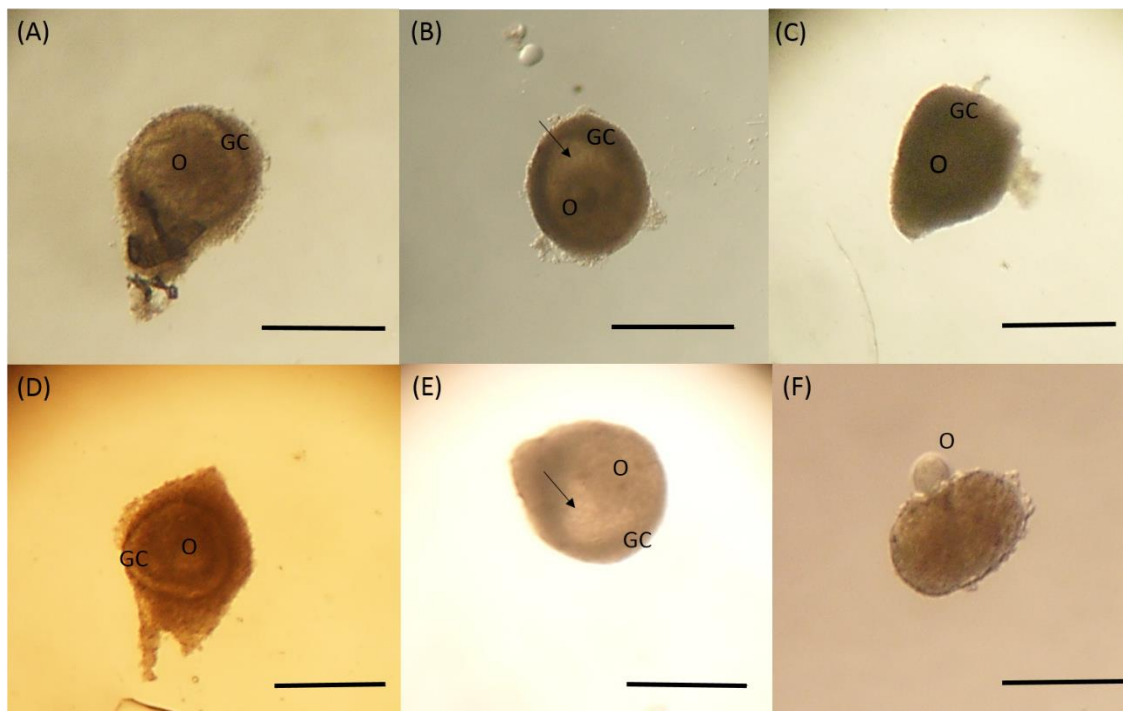
Experimento 1

Morfologia e desenvolvimento folicular após o cultivo in vitro

Folículos morfologicamente normais apresentavam oócitos centralmente localizado e células da granulosa normais, que eram circundados por uma membrana basal intacta (Fig. 2A). Já no dia 6 de cultivo, a formação de uma pequena cavidade antral (Fig. 2B) e folículos atrésicos (Fig. 2C) poderiam ser observados em todos os tratamentos. Não foram observados folículos extrusos no experimento 1.

A percentagem de folículos morfologicamente normais diminuiu significativamente a partir do dia 0 até o dia 12 de cultivo em todos os tratamentos (Fig. 3A). No entanto, independentemente do tempo de cultivo, as percentagens de folículos normais foram semelhantes ($P > 0,05$) entre o meio controle (α -MEM) e todas as concentrações de extrato de *A. cearensis*. No dia 12 de cultivo, a sobrevivência folicular foi significativamente maior no tratamento 0,2 mg/mL *A. cearensis* do que nas demais concentrações de *A. cearensis*.

Figura 2 – Folículos secundários morfologicamente normais no dia 0 (A e D), folículos antrais (B e E), atrésico (C) e extruso (F) após 6 dias de cultivo. Experimento 1: A-C; Experimento 2: D-F. GC: células da granulosa; O: oócito. Setas: cavidade antral. Barra de escala: 250 μ m (100x ampliação).



Todos os tratamentos induziram a um aumento significativo das taxas de formação de cavidade antral desde o dia 0 até ao dia 6 de cultivo, exceto o tratamento 0,1 mg/mL de *A. cearensis* (Fig. 3B). No final do cultivo, a formação de antro foi mais elevada nos tratamentos α -MEM e 0,2 mg/mL de *A. cearensis* do que no tratamento 0,1 mg/mL *A. cearensis* ($P < 0,05$). No dia 12 de cultivo, folículos cultivados em 0,4 mg/mL de *A. cearensis* apresentavam maior diâmetro do que os folículos dos demais tratamentos ($P < 0,05$; Fig. 3C), exceto em comparação ao tratamento 0,2 mg/mL de *A. cearensis*. No entanto, não houve diferenças significativas na taxa de crescimento diário (Fig. 3D) ou no aumento médio do diâmetro (6,4 μ m para o controle; 6,0 μ m em Amb 0,1; 13,1 μ m para Amb 0,2 e 11,3 μ m para Amb 0,4 mg/mL) entre os tratamentos. No final do cultivo, a percentagem de oócitos com diâmetro ≥ 110 μ m foi semelhante ($P > 0,05$) entre o meio controle e o tratamento 0,2 mg/mL de *A. cearensis*, sendo ambos significativamente mais elevados que os demais tratamentos (Tabela 1).

Figura 3 - Experimento 1: Percentagens de folicúlos morfologicamente normais (A), formação de antro (B), diâmetro folicular (C) e taxa de crescimento diário (D) em α -MEM ou diferentes concentrações de extrato *Amburana cearensis* (Amb 0,1; 0,2 e 0,4 mg/mL). (A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P < 0,05$); (a, b, c) Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de cultivo no mesmo tratamento ($P < 0,05$).

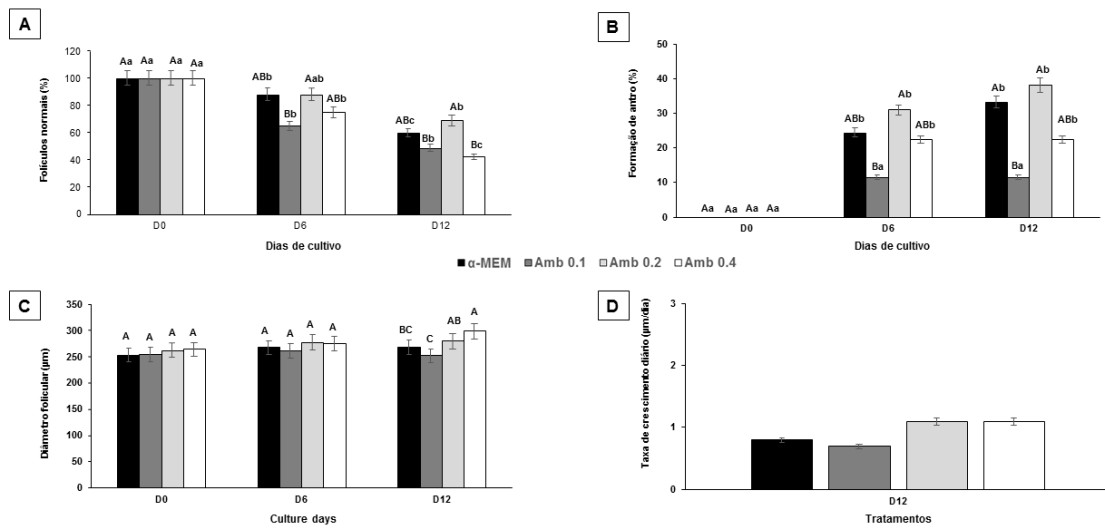


Tabela 1 - Percentagem de oócitos completamente crescidos ($> 110 \mu\text{m}$) após 12 dias de cultivo de folicúlos pré-antrais caprinos em α -MEM ou em diferentes concentrações de extrato *Amburana cearensis* sem suplementos (Experimento 1).

Tratamentos	% oócitos totalmente crescidos
α -MEM	42,22 (19/45) A
Amb 0,1	16,20 (7/45) B
Amb 0,2	30,95 (14/45) A
Amb 0,4	7,50 (3/45) B

(A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

Experimento 2

Morfologia e desenvolvimento folicular após o cultivo *in vitro*

Com base nos resultados descritos acima (experimento 1), avaliamos a eficácia da adição de um mix de suplementos, sozinhos ou associados com FSH em concentrações crescentes, no meio controle (α -MEM) e em meio composto por extrato de *A. cearensis* na concentração de 0,2 mg/mL sobre o desenvolvimento folicular *in vitro*. A Figura 2 mostra folículos ovarianos caprinos antes (Fig. 2D) e após o cultivo *in vitro* no experimento 2, sendo possível observar, a partir do dia 6 de cultivo, a formação de cavidade antral em todos os tratamentos (Fig. 2E) e folículos extrusos apenas em meio contendo FSH (Fig. 2F).

A percentagem de folículos morfologicamente normais no experimento 2 diminuiu significativamente a partir do dia 0 até ao dia 12 em todos os tratamentos (Fig. 4A). No final do cultivo, não houve diferença significativa ($P > 0,05$) na percentagem de folículos morfologicamente normais entre todos os meios suplementados, incluindo os tratamentos com FSH. Além disso, esses meios de cultivo possuem mais folículos normais ($P < 0,05$) do que os meios básicos sem suplementos.

A taxa de formação de antro no dia 12 de cultivo foi significativamente mais elevada em ambos os meios de base suplementados com FSH do que nos meios não suplementados (α -MEM e 0,2 mg/mL de extrato da *A. cearensis*) e semelhante ($P > 0,05$) aos outros meios suplementados (Fig. 4B). O diâmetro folicular não diferiu ($P > 0,05$) entre os tratamentos após 12 dias de cultivo (Fig. 4C). No entanto, a suplementação de *A. cearensis* com FSH (Amb 0,2⁺ mg/mL + FSH) apresentou taxas de crescimento diárias semelhantes ($P > 0,05$) para Amb 0,2⁺ mg/mL e significativamente superiores aos demais tratamentos (Fig. 4D). Além disso, os folículos cultivados em meio composto de 0,2 mg/mL de *A. cearensis* + FSH apresentaram maior aumento médio do diâmetro ($P < 0,05$) do que os outros tratamentos (6,6 μ m no controle; 11,0 μ m em Amb 0,2; 6,2 μ m em α -MEM⁺; 14,6 μ m em Amb 0,2⁺; 10,8 μ m em α -MEM⁺ + FSH e 23,4 μ m em Amb 0,2⁺ + FSH). No final do cultivo, a percentagem de oócitos com diâmetro $\geq 110 \mu$ m foi significativamente mais elevada nos tratamentos suplementados com FSH sequencial do que em α -

MEM e Amb 0,2 mg/mL (ambos sem suplementos), mas semelhante ($P>0,05$) aos demais tratamentos suplementados (Tabela 2).

Figura 4 - Experimento 2: Percentagens de folículos morfologicamente normais (A), formação de antro (B), diâmetro folicular (C) e taxa de crescimento diário (F) em α -MEM ou em extrato de *Amburana cearensis* (0,2 mg/mL), ambos na ausência ou na presença de suplementos ou FSH. (A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos no mesmo período ($P<0,05$); (a, b, c) Letras minúsculas indicam diferenças significativas entre os períodos de cultivo no mesmo tratamento ($P<0,05$).

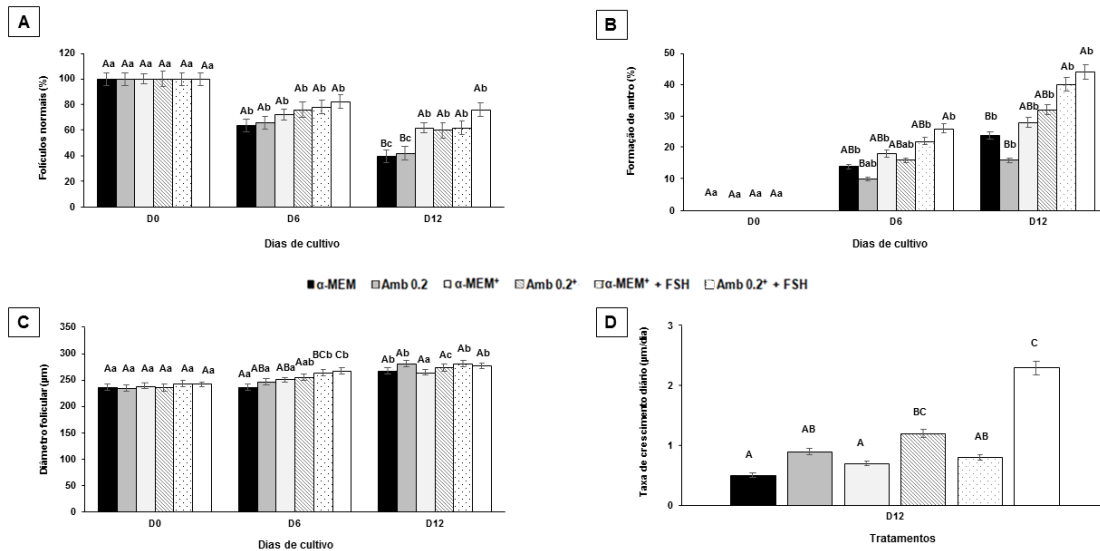


Tabela 2 - Percentagem de oócitos completamente crescidas (> 110 μ m) após 12 dias de cultivo de folículos pré-antrais caprinos em α -MEM ou em extrato de *Amburana cearensis* (0,2 mg/mL), na ausência ou na presença de suplementos ou FSH (Experiment 2).

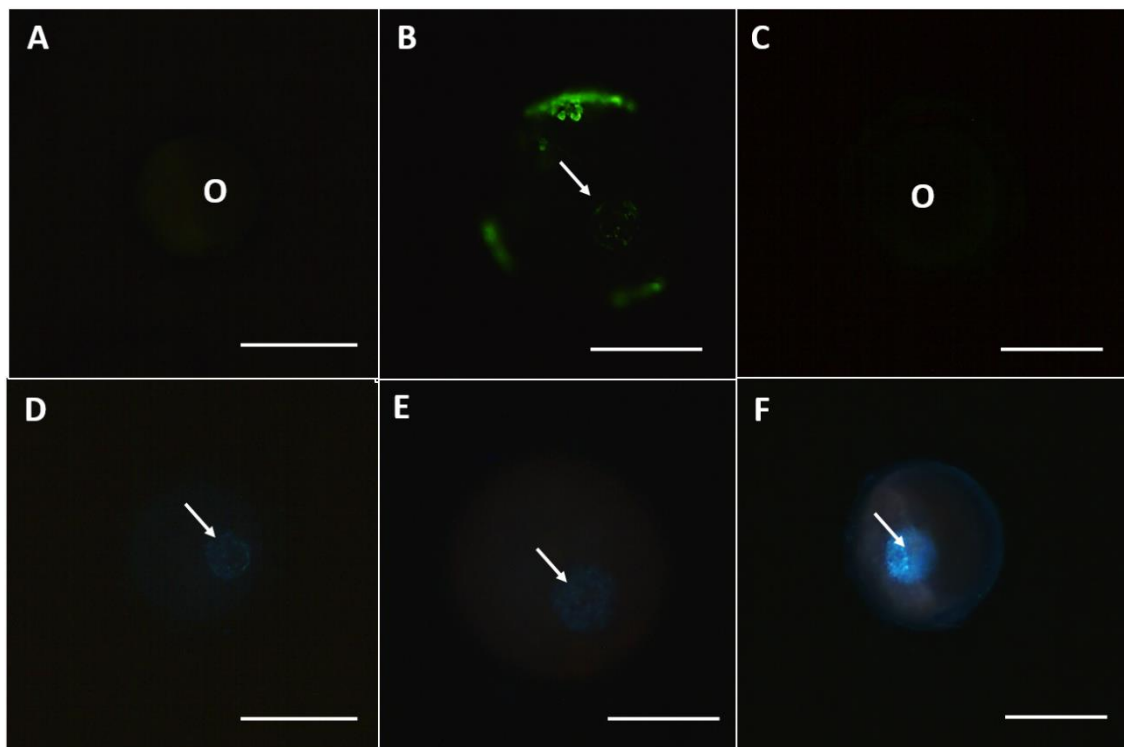
Tratamentos	% oócitos totalmente crescidos
α -MEM	26,0 (13/50) A
Amb 0,2	20,0 (10/50) A
α -MEM ⁺	36,0 (18/50) AB
Amb 0,2 ⁺	30,0 (15/50) AB
α -MEM ⁺ +FSH	44,0 (22/50) B
Amb 0,2 ⁺ +FSH	42,5(21/50) B

(A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P<0,05$).

Detecção de oócitos apoptóticos após o cultivo in vitro pela análise de TUNEL

A análise de TUNEL revelou a ausência ou pouquíssimos oócitos apoptóticos após 12 dias de cultivo (Fig. 5A). Todos os oócitos estavam apoptóticos no controle positivo (Fig. 5B) e o controle negativo não apresentou marcação para análise de TUNEL (Fig. 5C). Todos os oócitos apresentaram marcação da cromatina com Hoechst 33342 em fluorescência azul (Fig. 5D-F). Não houve diferenças ($P > 0,05$) na porcentagem de oócitos TUNEL-positivos entre os tratamentos (dados não apresentados).

Figura 5 - Representação da fragmentação de DNA em oócitos caprinos após 12 dias de cultivo. Folículo pré-antral normal em 0,2 mg/mL de *A. cearensis* (A e D), folículo apoptótico no controle positivo (B e E) e o controle negativo (C e F). Oócitos marcados com TUNEL (A, B, C) e Hoechst 33342 (D, E, F). Note a fragmentação de DNA evidenciada pela cromatina marcada em verde na figura B. O: oócito. Barras de escala: 100 μ m.



Níveis intracelulares de GSH e de mitocôndrias ativas

Os oócitos cultivados em ambos os tratamentos suplementados com FSH sequencial apresentaram maior nível de GSH intracelular ($P < 0,05$) do que α -MEM e Amb a 0,2 mg/mL (ambos sem suplementos), e nível semelhante ($P > 0,05$) aos demais tratamentos (Fig. 6). Resultados semelhantes foram observados para a atividade mitocondrial (Fig. 7).

Figura 6 – Fotomicrografia de epifluorescência de oócitos caprinos marcados com CellTracker® Blue (A-F) para detecção dos níveis intracelulares de GSH: oócitos cultivados em α -MEM (A) ou em Amb 0,2 mg/mL (B) (ambos sem suplementos), em α -MEM⁺ suplementado (C) ou em Amb 0,2⁺ mg/mL (D) e em α -MEM⁺ + FSH (E) ou Amb 0,2⁺ + FSH (F) e nível relativo (pixel/oócito) de glutationa (GSH) intracelular em oócitos de cabras após 12 dias de cultivo *in vitro* em α -MEM ou em extrato de *A. cearensis* (0,2 mg/mL), ambos na ausência ou presença de suplementos ou FSH (G). Barra de escala: 75 μ m. (A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).

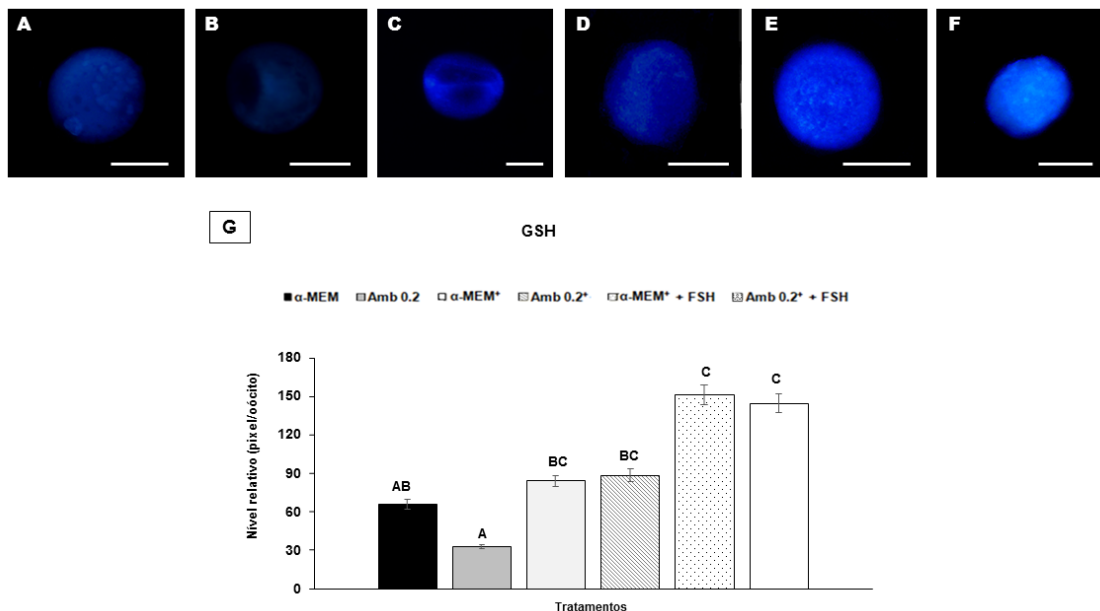
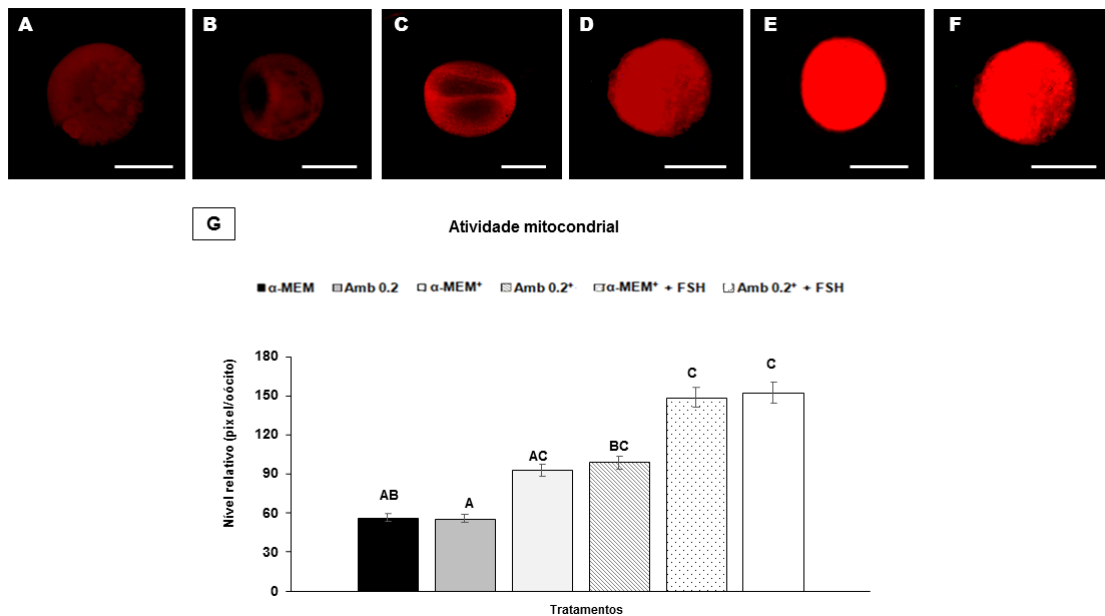


Figura 7 – Fotomicrografias de epifluorescência de oócitos caprinos marcados com MitoTracker® Red (A-F) para detecção dos níveis intracelulares de mitocôndrias ativas: oócitos cultivados em α -MEM (A) ou em Amb 0,2 mg/mL (B), ambos sem suplementos, em α -MEM⁺ suplementado (C) ou em Amb 0,2⁺ mg/mL (D) e em α -MEM⁺ + FSH (E) ou Amb 0,2⁺ + FSH (F) e nível relativo (pixel/oócito) de atividade mitocondrial intracelular em oócitos de cabras após 12 dias de cultivo *in vitro* em α -MEM ou em extrato de *A. cearensis* (0,2 mg/mL), ambos na ausência ou presença de suplementos ou FSH (G). Barra de escala: 75 μ m. (A, B, C) Letras maiúsculas indicam diferenças significativas entre os tratamentos ($P < 0,05$).



Discussão

Este estudo é o primeiro relato acerca da avaliação dos efeitos do extrato de *A. cearensis* sobre o cultivo *in vitro* de folículos ovarianos caprinos. No experimento 1, os suplementos não foram adicionados ao meio para verificar se o extrato da planta sozinho influenciaria na morfologia e desenvolvimento folicular. Após 12 dias de cultivo, o meio controle (α -MEM) e o meio composto por 0,2 mg/mL de extrato de *A. cearensis*, ambos sem suplementos, possuem percentagens semelhantes de folículos morfologicamente normais, formação de antro e oócitos completamente crescidos.

Já demonstramos que o extrato etanólico de *A. cearensis*, que foi o mesmo utilizado no trabalho atual, contém ácido gálico, ácido protocatecuico, epicatequina, ácido *p*-cumárico e kampferol (GOUVEIA et al., 2015). O ácido gálico e ácido protocatecuico (PCA), fenóis endógenos das plantas encontrados em grandes quantidades no extrato de *A. cearensis*, têm sido estudados devido a suas propriedades antioxidantes, cardioprotetora e potencial anti-carcinogênico (PUNITHAVATHI et al., 2011; KAKKAR et al., 2014). Estudos em ratos sugerem que o ácido gálico tem atividade neuroprotetora contra o estresse oxidativo induzido por 6-hidroxi-dopamina através do aumento dos níveis de glutathiona peroxidase (GPx) (MANSOURI et al., 2013) e que o PCA reduz a apoptose *in vitro* em células neuronais, através da redução nos níveis de EROs e aumento nos níveis de enzimas antioxidantes, tais como a catalase (CAT) (GUAN et al., 2011). Os flavonóides epicatequina, kampferol e ácido *p*-cumárico agem diretamente na eliminação de EROs através da ação de várias enzimas (CAT, GSH, GPx), reduzindo, assim, o dano no DNA em diferentes tipos de células (ZANG et al., 2000; SHAKYA et al., 2013; SHIN et al., 2014). Portanto, em nosso estudo, pode-se sugerir que esses antioxidantes naturais podem ter agido isoladamente ou em associação para manter a sobrevivência e promover o desenvolvimento de folículos pré-antrais caprinos cultivados em 0,2 mg/mL de *A. cearensis* semelhante ao α -MEM, que é um meio comercial, que contém aminoácidos não essenciais, hidratos de carbono, piruvato de sódio, ácido lipóico, biotina, vitaminas e precursores de DNA (FAUSTINO et al., 2013). Além disso, no presente estudo, a percentagem de folículos normais e a taxa de oócitos $\geq 110 \mu\text{m}$ foi maior em 0,2 mg/mL de *A. cearensis* em comparação com as outras concentrações da planta. É possível que 0,1 mg/mL de *A. cearensis* tenha sido insuficiente para a manutenção da sobrevivência folicular e que uma concentração mais elevada (0,4 mg/mL) pode ter potencializado os efeitos citotóxicos de alguns compostos, tais como ácido *p*-cumárico, que mostrou ter efeito citotóxico em neuroblastoma após 72 h de tratamento, promovendo um aumento nos níveis de EROs (SHAILASREE et al., 2014).

Nós ainda hipotetizamos que a viabilidade folicular possa ser influenciada pela adição de suplementos (BSA, insulina, transferrina, selênio, glutamina, hipoxantina e ácido ascórbico) ou FSH, e que as taxas de crescimento de folículos cultivados em meio suplementado, especialmente em extrato de *A. cearensis*,

seriam superiores às taxas dos meios não suplementados. Essa hipótese foi confirmada no experimento 2. No final do período do cultivo, todos os meios suplementados apresentaram maior percentual de folículos normais do que os meios não suplementados. Estudos anteriores também demonstraram que a adição de suplementos no meio de cultivo de base pode manter a viabilidade dos folículos ovarianos (SILVA et al., 2004; PENG et al., 2010), especialmente devido ao potencial antioxidante (ácido ascórbico, selênio e transferrina) ou por sua ação como substrato energético (glutamina e BSA) para as células foliculares (SONGSASEN; SPINDLER; WILDT, 2007; ABEDELAHI et al., 2010; RODRIGUES et al., 2010). Alguns autores mostraram que concentrações definidas de FSH recombinante bovino, adicionadas em momentos específicos do cultivo e de um modo progressivo, mantêm a sobrevivência de folículos caprinos comparado ao meio controle suplementado (SARAIVA et al., 2010). Em contraste, nós não observamos qualquer diferença entre os meios suplementados (com ou sem FSH). Estas diferenças nos resultados poderiam ser devido às diferentes origens de FSH utilizados (bovino x humano). Além disso, seria necessário um período de cultivo maior para observar uma mudança significativa na viabilidade folicular ou formação de cavidade antral em meio isento de FSH.

O aumento médio no diâmetro foi máximo na combinação de suplementos juntamente com FSH no meio de *A. cearensis*). Sabe-se que após a formação do antro, o folículo se torna dependente de gonadotrofinas (ERICKSON; SHIMASAKI, 2001), o que sugere que o uso de FSH pode ser necessário para dar um maior suporte ao crescimento folicular. Além disso, nós recentemente mostramos que o extrato de *A. cearensis* promove o desenvolvimento de folículos secundários isolados ovinos *in vitro* (BARBERINO et al., 2015). Desta forma, poderia ser pensado que algum composto do extrato de *A. cearensis* (por exemplo APC, que estimulou a proliferação *in vitro* de células tronco neurais de rato – GUAN et al., 2009) pode interagir com os suplementos e FSH, estimulando as taxas de crescimento do folículo caprino.

Finalmente, observamos que ambos os meios que contêm suplementos e FSH melhoram os níveis foliculares de GSH e mitocôndrias ativas, em comparação aos meios não suplementados. Esses parâmetros estão relacionados com a potencial capacidade de desenvolvimento e fertilização dos oócitos (ZUELKE et al., 2003; CASTANEDA et al., 2013). A GSH é um antioxidante endógeno e pode

desempenhar um papel importante na síntese de DNA e proteínas, proteção celular durante o estresse oxidativo e a proliferação celular durante eventos embrionárias (GARCÍA-GIMÉNEZ et al., 2013; TIMME-LARAGY et al., 2013). As mitocôndrias estão diretamente envolvidas em níveis variados no processo reprodutivo, uma vez que seu estado funcional influencia na qualidade dos oócitos e contribuição para o processo de fertilização e desenvolvimento embrionário (DUMOLLARD et al., 2007), e parte das defesas antioxidantes são formadas nas mitocôndrias (DUMOLLARD et al., 2009). Além disso, a baixa atividade mitocondrial parece ser uma característica de oócitos bovinos que não sofreram maturação adequada (TARAZONA et al., 2006). Assim, os nossos resultados evidenciam que a adição de suplementos e FSH ao meio é importante para assegurar o crescimento folicular e a proteção contra o estresse oxidativo, devido a sua capacidade de aumentar os níveis de GSH (provavelmente diminuindo EROs) e a atividade mitocondrial. Este poderia ser um dos fatos relacionados com os poucos oócitos apoptóticos encontrados após cultivo.

Em conclusão, este estudo mostrou que extrato de *A. cearensis* (0,2 mg/mL) adicionado de suplementos e FSH melhora o crescimento, os níveis de GSH e a atividade mitocondrial. Este extrato pode ser um meio de base alternativo, barato (cerca de 40 vezes menos que α -MEM) e eficiente para o desenvolvimento de folículos pré-antrais. Porém mais estudos são necessários para promover a maturação dos oócitos crescidos *in vitro* para utilização em técnicas de fertilização.

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Este trabalho foi pioneiro na avaliação do desenvolvimento, apoptose, níveis intracelulares de GSH e atividade mitocondrial *in vitro* de folículos secundários caprinos cultivados em meio à base de extrato de *A. cearensis*, planta de grande importância econômica e social para as comunidades da região do Semiárido Brasileiro. Foi possível demonstrar que uma concentração adequada do extrato de *A. cearensis* (0,2 mg/mL), adicionada de suplementos e em associação com FSH, mantém a sobrevivência e melhora o crescimento, os níveis de GSH e a atividade mitocondrial de folículos isolados caprinos após cultivo *in vitro*. A utilização deste extrato pode ser uma alternativa barata e eficiente de meio de cultivo para o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais. Recomenda-se a realização de estudos futuros com o intuito de aperfeiçoar o meio de cultivo à base de extrato de *A. cearensis*, visando a obtenção de oócitos competentes à maturação e fertilização *in vitro*, culminando na produção *in vitro* de embriões.

REFERÊNCIAS

- ABEDELAAHI, A.; SALEHNIA, M.; ALLAMEH, A. The effects of different concentrations of sodium selenite on the *in vitro* maturation of preantral follicles in serum-free and serum supplemented media. **J Assis Reprod Gen**, v.25, p. 483–488, 2008.
- ABEDELAAHI, A.; SALEHNIA, M.; ALLAMEH, A.A.; DAVOODI, D. Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. **Hum Reproduction**, v. 25, p. 977–985, 2010.
- ABDEL-WAHAB, M.H. et al. Influence of *p*-coumaric acid on doxorubicin-induced oxidative stress in rat's heart. **Pharmacol Res**, v. 48, p. 461–465, 2003.
- ABIR, R. et al. Turner's syndrome and fertility: Current status and possible future. **Projects Human Reprod**, v. 7, p. 603-610, 2001.
- ADESINA, S.K. Chemical examination of *Khaya ivonensis* and *Khaya sebegalensis*. **Fitoterapia**, v. 54: p.141-143, 1983.
- ALBUQUERQUE, U. P.; OLIVEIRA, R. F. Is the use-impact on native caatinga species in Brazil reduced by the high species richness of medicinal plants? **J Ethnopharmacol**, v. 113, p. 156–170, 2007.
- AMSTERDAM, A. et al. Alternative pathways of ovarian apoptosis: death for life. **Biochem Pharm**, v. 66, p. 1355-1362, 2003.
- ANDRADE, E.R. et al. Consequências da produção das espécies reativas de oxigênio na reprodução e principais mecanismos antioxidantes. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, v. 34, p.79-85, 2010.
- ANDRADE, E.R. et al. Effects of ascorbic acid on *in vitro* culture of bovine preantral follicles. **Zygote**, v. 5, p. 1-10, 2012.
- ARAÚJO, V. R. et al. *In vitro* culture of bovine preantral follicles: a review. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 12, p. 1-14, 2014.
- ARUNAKUMARI, G. et al. Effect of hormones and growth factors on *in vitro* development of sheep preantral follicles. **Small Rumin Res**, v. 70, p. 93–100, 2007.
- ARUNAKUMARI, G., SHANMUGASUNDARAM, N., RAO, V.H. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. **Theriogenology**, v. 74, p. 884–894, 2010.
- BAILLET, A.; MANDON-PEPIN, B. Mammalian ovary differentiation. A focus on female meiosis. **Mol Cell Endocrinol**, v. 356, p. 13-23, 2012.

BALASUNDRAM et al. Phenolic compounds in plants and agri-industrial by-products: Antioxidant activity, occurrence, and potential uses. **Food Chem**, v. 99, p. 191–203, 2006.

BARBERINO, R.S. et al. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes *in vitro* development of ovine secondary follicles. **Zygote**, v. 24, p. 1-9, 2015.

BARBOSA, M. R. et al. Geração e desintoxicação enzimática de espécies reativas de oxigênio em plantas. **Ciênc Rural**, v. 44. p. 453-460, 2014.

BARNETT, K. R. et al. Ovarian follicle development and transgenic mouse models. **Human Reprod Update**, v. 12, p. 537-55, 2006.

BARROS, L.F.; HERMOSILLA, T.; CASTRO, J. Necrotic volume increase and the early physiology of necrosis. **Comp Biochem Physiol**, v. 130, p. 401-409, 2001.

BARROS, V.R.P. et al. Immunolocalization of Melatonin and Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Caprine Ovaries and their Effects During *in vitro* Development of Isolated Pre-Antral Follicles. **Reprod Domest Anim**, v.48, p. 1025–1033, 2013.

BOSSAERT, P., COCK, H. D., LEROY, J. L. M. R., CAMPENEERE, S. D., BOLS, P. E. J., Filliers, M., and Opsomer, G. Immunohistochemical visualization of insulin receptors in formalin-fixed bovine ovaries post mortem and in granulosa cells collected *in vivo*. **Theriogenology**, v. 73, p. 1210–1219, 2010.

BRAVO, B. & SAUVAIN, M. Bioactive phenolic glycosides from *Amburana cearensis*. **Phytochemistry**, v. 50, p. 71–74, 1999.

BRISTOL-GOULD, S., WOODRUFF, T.K. Folliculogenesis in the domestic cat (*Felis catus*). **Theriogenology**, v. 66, p. 5-13, 2006.

CALDERÓN-MONTAÑO, J.M. et al. Review on the Dietary Flavonoid Kaempferol. **Mini Rev Med Chem**, v. 11, p. 298-394, 2011.

CANUTO, K.M., SILVEIRA, E.R. Constituintes químicos da casca do caule de *Amburana cearensis* A.C. Smith. **Quim Nova**, v. 29, p. 1241–1243, 2006.

CARTAXO, S.L., SOUZA, M.M.A., ALBUQUERQUE, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 131, p. 326–342, 2010.

CASTANEDA, C.A. et al. Circulating concentrations of leptin, ovarian follicle number, and oocyte lipid content and active mitochondria, in Zebu crossbred cows maintained on standard or improved nutrition. **Anim Reprod Sci**, v. 140, p. 7–13, 2013.

CAVALCANTE et al. Kit ligand promotes the transition from primordial to primary follicles after *in vitro* culture of ovine ovarian tissue. **Zygote**, v. 24, p. 1-5, 2015.

CELESTINO, J. J. H. et al. Recombinant epidermal growth factor maintains follicular ultrastructure and promotes the transition to primary follicles in caprine ovarian tissue cultured *in vitro*. **Reprod Sci**, v. 16, p. 239-246, 2009.

CHAVES, R.N. et al. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Reprod Fertil Dev**, v. 20, p. 640-647, 2008.

CHAVES, R.N. et al. The Effects of Insulin and FSH During *In vitro* Development of Ovarian Goat Preantral Follicles and the Relative mRNA Expression for Insulin and FSH Receptors and Cytochrome P450 Aromatase in Cultured Follicles. **Biol Reprod**, v. 69, p. 1-11, 2012.

CHEN, Q. et al. Cross-talk between fas/fas ligand system and nitric oxide in the pathway subserving granulosa cell apoptosis: a possible regulatory mechanism for ovarian follicle atresia. **Endocrinology**, v.146, p.808-815, 2005.

CHEN, H.M. et al. Gallic acid, a major component of *Toona sinensis* leaf extracts, contains a ROS-mediated anti-cancer activity in human prostate cancer cells. **Cancer Lett**, v. 286, p. 161–171, 2009.

CHEN, H. et al. Identification of Novel Markers of Mouse Fetal Ovary Development. **PlosOne**, v. 7, p. 1-15, 2012.

CHEN, C.Y. et al., Gallic Acid Induces a Reactive Oxygen Species-Provoked cJun NH2-Terminal Kinase-Dependent Apoptosis in Lung Fibroblasts. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 13, p. 6139-61550, 2013.

COSTA-LOTUFO, L.V. et al. Antiproliferative effects of several compounds isolated from *Amburana cearensis* A.C. Smith, Z. **Naturforsch B J Chem Sci**, v. 58, p. 675–80, 2003.

CRESPO, I. et al. A comparison of the effects of kaempferol and quercetin on cytokine-induced pro-inflammatory status of cultured human endothelial cells. **Br J Nutr**, v. 100, p. 968-976, 2008.

CUMMINS, J.M. The role of mitochondria in the establishment of oocyte functional competence. **Eur J Obstet Gyn R B**, v. 115, p. 23–29, 2004.

DANTAS, A. N. S. Acaricidal activity of *Amburana cearensis* on the cattletick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus*. **Ciênc Rural**, v. 46, p. 536-541, 2015.

DEMESTERE, I. et al. Impact of various endocrine and paracrine factors on *in vitro* culture of preantral follicles in rodents. **Reproduction**, v.130, p.147–156, 2005.

DRIANCOURT, M. A. Regulation of ovarian follicular dynamics in farm animals. Implications for manipulation of reproduction. **Theriogenology**, v. 55, p. 1211-1239, 2001.

DUMOLLARD, R.; DUCHEN, M.; CARROLL, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. **Curr Top Dev Biol**, v. 77, p. 21–49, 2007.

DUMOLLARD, R et al. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. **Semin Cell Dev Biol**, v. 20, p. 346–353, 2009.

ENGLER, M.B.; ENGLER, M.M. The emerging role of flavonoid-rich cocoa and chocolate in cardiovascular health and disease. **Nutr Rev**, v. 64, p. 109–118, 2006.

ERICKSON, G.F.; SHIMASAKI, S. The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. **Fertil Steril**, v. 76, p. 5, 2001.

ESMAIELZADEH, F. et al. Kit ligand and glial-derived neurotrophic factor as alternative supplements for activation and development of ovine preantral follicles *in vitro*. **Mol Reprod Dev**, v. 80, p. 35–47, 2013.

FARBER, J.L. Membrane injury and calcium homeostasis in the pathogenesis of coagulative necrosis. **Lab Invest**, v. 47, p. 114-123, 1982.

FAUSTINO, L.R. et al. Expression of Keratinocyte Growth Factor in goat ovaries and its effects on preantral follicles within cultured ovarian cortex. **Reprod Sci**, v. 18, p. 1222-1229, 2011.

FAUSTINO, L.R. et al. Interaction between keratinocyte growth factor-1 and kitligand on the goat preantral follicles cultured *in vitro*. **Small Rumin Res**, v. 114, p. 112-119, 2013.

FAVALORO, B. et al. Role of Apoptosis in disease. **Aging**, v.4, p. 330-349, 2012.

FERK, F. et al. Potent protection of gallic acid against DNA oxidation: results of human and animal experiments. **Mutat Res**, v. 715, p. 61-71, 2011.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Preservation of oocyte and granulosa cell morphology in bovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Theriogenology**, v. 41, p. 1333-1346, 1994.

FIGUEIREDO, J.R. Essential role of follicle stimulating hormone in the maintenance of caprine preantral follicle viability *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 173-182, 2007.

FIGUEIREDO, J.R. et al. Manipulação de Oócitos Inclusos em Folículos Ovarianos Pré-antrais. **Biotécnicas Aplicadas à Reprodução Animal**, 2ª edição, p. 303–327, 2008.

FIGUEIREDO, J. R. et al. Desenvolvimento e aplicações do ovário artificial em caprinos. **Rev Bras Reprod Anim**, Belo Horizonte, n.6, p.55-58, 2009.

FIGUEIREDO J. R. et al. Cryopreservation and *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Reprod Fertil Dev**, v. 23, p. 40–47. 2011.

FORTUNE, J.E. The early stages of follicular development: activation of

primordial follicles and growth of preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 78, p.135-163, 2003.

FORTUNE, J.E. et al. Triennial Reproduction Symposium: the ovarian follicular reserve in cattle: what regulates its formation and size? **J Anim Sci**, v. 91, p.3041-3050, 2013.

GAO, Z. et al. Protective effects of flavonoids in the roots of *Scutellaria baicalensis* Georgi against hydrogen peroxide-induced oxidative stress in HS-SY5Y cells. **Pharmacol Res**, v. 43, p. 173-8. 2001.

GARCÍA-GIMÉNEZ, J.L. et al. Nuclear glutathione. **Biochim Biophys Acta**, v. 1830, p. 3304– 3316, 2013.

GOUGEON, A. Human ovarian follicular development: from activation of resting follicles to preovulatory maturation. **Ann Endocrinol (Paris)**. v. 71, p.132-43, 2010.

GOUVEIA, B.B. et al. Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. **Anim Reprod**, Belo Horizonte, v. 12, p. 316-323, 2015.

GREEN, D. R.; KROEMER, G. The pathophysiology of mitochondrial cell death. **Science**, v. 305, p. 626-629, 2004.

GUAN, S et al. Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells. **Toxicol in vitro**; v. 23, p. 201–208 2009.

GUAN, S. et al. Protocatechuic acid promotes the neuronal differentiation and facilitates survival of phenotypes differentiated from cultured neural stem and progenitor cells. **Eur J Pharmacol**, v. 670, p. 471-478, 2011.

GUPTA, P.S.P. et al. Production of buffalo embryos using oocytes from *in vitro* grown preantral follicles. **Zygote**, v. 16, p. 57-63, 2008.

GUTIERREZ, C.G. et a. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture in vitro. **Biol Reprod**, v. 62, p. 1322-1328, 2000.

HAMALAINEN, M.; et al. Anti-inflammatory effects of flavonoids: genistein, kaempferol, quercetin, and daidzein inhibit STAT-1 and NF-kappaB activations, whereas flavone, isorhamnetin, narin-genin, and pelargonidin inhibit only NF-kappaB activation along with their inhibitory effect on iNOS expression and NO production in activated macrophages. **Mediators Inflamm**, v. 1, p. 456-473, 2007.

HELD, P. An Introduction to Reactive Oxygen Species Measurement of ROS in Cells. **BioTek Instruments**, Inc, 2015.

HENNET, M.L.; COMBELLES, C.M. The antral follicle: a microenvironment for oocyte differentiation. *Int J Dev Biol*, v. 56, p. 819-31, 2012.

HIGGINS, N.P et al. Purification of subunits of Escherichia coli DNA gyrase and reconstitution of enzymatic activity. **Proc Natl Acad Sci**. v .75, p. 1773-1177, 1978.

HONG, J-T. et al. Regulation of heme oxygenase-1 expression and MAPK pathways in response to kaempferol and rhamnocitrin in PC12 cells. **Toxicol Appl Pharmacol**, v. 237, p. 59–68, 2009.

HUSSEIN, M.R. Apoptosis in the ovary: molecular mechanisms. **Hum Reprod Up**, v. 11, p. 162-178, 2005.

HUTT, K. J.; ALBERTINI, D.F. An oocentric view of folliculogenesis and embryogenesis. **Reprod Biomed Online**, v. 14, p. 758-764, 2007.

HUTT, K. The role of BH3-only proteins in apoptosis within the ovary. **Reproduction**, v. 149, p. 1470-1626, 2015.

JAGARLAMUDI, K.; RAJKOVIC, A. Oogenesis: Transcriptional regulators and mouse models. **Mol Cell Endocrinol**, v. 356, p. 31-39, 2012.

JIANG, X.; WANG, X. Cytochrome c-mediated apoptosis. **Annu Rev Biochem**, v. 73, p. 87-106, 2004.

JOHN, G.B. et al. Foxo3 is a PI3K- dependent molecular switch controlling the initiation of oocyte growth. **Dev Biol**, v. 321, p. 197-204, 2008.

JOHNSON, J. et al. Oocyte generation in adult mammalian ovaries by putative germ cells in bone marrow and peripheral blood. **Cell**, v. 122, p. 303-315, 2004.

JUNQUEIRA, L.C.; CARNEIRO, J. **Histologia básica**. 4. ed. Rio de Janeiro: Kookan S.A, 2004. 432p.

KAKKAR, S.; BAIS, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. **ISRN Pharmacol**, v. 2014, p. 1-9, 2014.

KANG, J.W. et al. Kaempferol and quercetin, components of Ginkgo biloba extract (EGb 761), induce caspase-3-dependent apoptosis in oral cavity cancer cells. **Phytother Res**, v. 24, p. 77-82, 2010.

KASHKA R.H., ZAVAREH S., LASHKARBOLUKI T. The role of Coenzyme Q10 on the Total Antioxidant Capacity of Mouse Vitrified Pre-Antral Follicles. *Journal of Paramedical Sciences*. Vol.6, No.3, p. 1-9, 2015.

KATSKA-KSIAZKIEWICZ, L. Recent achievements in *in vitro* culture and preservation of ovarian follicles in mammals. **Reprod Biol**, v. 6, p. 3-16, 2006.

KIM, J.K.; LEE, C.J. Effect of exogenous melatonin on the ovarian follicles in gamma-irradiated mouse. **Mutat Res**, v. 449, p. 33-39, 2000.

KIM, Y.. Antimelanogenic and Antioxidant Properties of Gallic Acid. **Biol Pharm Bull**, v. 30, p. 1052-1055, 2007.

KIM, C. H. et al. Epicatechin protects auditory cells against cisplatin-induced death. **Apoptosis**, v. 13, p. 1184-1194, 2008.

KIM, Y.S. et al. Protocatechuic acid extends lifespan and increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. **Arch Pharm Res**, v. 37, p. 245–52, 2014.

KOWALTOWSKI, A. **Participação da mitocôndria na regulação da viabilidade celular**. 2004. Dissertação (Livre-Docente junto ao Departamento de Bioquímica). Instituto de Química da Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004.

KRISTENSEN S.G. et al. Transcriptional profiling of five isolated size-matched stages of human preantral follicles. **Mol Cell Endocrinol**, v. 401, p. 189–201, 2015.

KWAK SS, et al. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*. 2012, v. 78, p. 86–101.

LEAL, L.K.A.M. et al. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis* protects mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. **Neurosci Lett**, v. 11, p. 86-90, 2005.

LEAL, L.K.A.M. et al. Mechanisms underlying the relaxation induced by isokaempferide from *Amburana cearensis* in the guinea-pig isolated trachea. **Life Sci**, v. 79, p. 98-104, 2006.

LEAL, L.K.A.M. et al. A comparative chemical and pharmacological study of standardized extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith., **Phytomedicine**, v. 18, p. 230-233, 2010.

LEITÃO, C.C.F. et al. Importância dos fatores de crescimento locais na regulação da foliculogênese ovariana em mamíferos. **Acta Sci Vet**, v. 37, p. 215-224, 2009.

LI, H.J. et al. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. **Anim Reprod Sci**, v. 114, p. 89–98, 2009.

LI, X. et al. Antioxidant Activity and Mechanism of Protocatechuic Acid *in vitro*. **Function Food Heal Disease**, v. 7, p. 232-244, 2011.

LIMA, L.F. et al. Dynamized follicle-stimulating hormone affects the development of ovine preantral follicles cultured *in vitro*. **Homeopathy**, v.102, p. 41-8, 2013.

LIMA-VERDE, I.B. et al. Implicações do estresse oxidativo no ovário e no embrião mamífero. **Med Vet**, v.1, p. 81-88, 2007.

LIMA-VERDE, I.B., et al. Effects of α -tocopherol and ternatin antioxidants on morphology and activation of goat preantral follicles *in vitro* cultured. *Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.61, n.1, p.57-65, 2009.

LIM, E.J.; CHOI, Y. Transcription factors in the maintenance and survival of primordial follicles. **Clin Exp Reprod Med**, v. 39, p.127-131, 2012.

LIU, K. et al. Control of mammalian oocyte growth and early follicular development by the oocyte PI3 kinase pathway: new roles for an old timer. **Develop Biol**, v. 299, p. 1-11, 2006.

LOPES, C.A.P. et al. Short-term preservation of canine preantral follicles: Effects of temperature, medium and time. **Anim Reprod Sci**, v. 115, p. 201-214, 2009.

LORET DE MOLA, J.R. et al. Comparison of two culture systems for the in-vitro growth and maturation of mouse preantral follicles. **Clin Exp Obste Gyneco**, v. 31, p.15–19, 2004.

LOIZZO, M.R. et al. Inhibition of angiotensin converting enzyme (ACE) by flavonoids isolated from *Ailanthus excelsa* (Roxb) (Simaroubaceae). **Phytother Res**, v. 21, p. 32–36, 2007.

LUCCI, C.M. et al. Effect of the interval of serial sections of ovarian in the tissue chopper on the number of isolated caprine preantral follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 56, p. 39-49, 1999.

LUCCI, C.M. et al. Light microscopical and ultrastructural characterization of goat preantral follicles. **Small Rumin Res**, v. 41, p. 61-69, 2001.

LUO, L. et al. Protocatechuic acid benefits proliferation and phenotypic maintenance of rabbit articular chondrocytes: An *in vitro* study. **Exp Ther Med**, v. 9, p. 1865-1870, 2015.

LUZ, V.B. et al. The effect of LIF in the absence or presence of FSH on the *in vitro* development of isolated caprine preantral follicles. **Reprod Dom Anim**. v. 47, p. 379-384, 2012.

MACEDO, E. S.; CARNEIRO, R. C.; MATAYOSHI, S. Nova modalidade no tratamento do carcinoma basocelular periocular: Imiquimode. **Rev Bras Oftalmol**, v. 66, p. 411-17, 2007.

MACEDO, T.J.S. **Efeito do resveratrol sobre o desenvolvimento *in vitro*, apoptose e atividade metabólica de folículos pré-antrais ovinos**. 2015. 93f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias no Semiárido). Universidade Federal do vale do São Francisco, Campus de Ciências Agrárias, Petrolina, 2015.

MAGALHÃES, D. M. et al. Impact of pituitary FSH purification on in vitro early folliculogenesis in goats. **Biocell**, v.33, p. 91-97, 2009.

MAGALHÃES, D. M. et al. Effect of the medium replacement interval on the viability, growth and *in vitro* maturation of isolated caprine and ovine pre-antral follicles. **Reprod Dom Anim**, 2010.

MAGALHÃES, D. M. et al. In vitro production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. **Theriogenology**, v. 75, p. 182-188, 2011.

MAIA, N.M. **Caatinga: árvores e arbustos e suas utilidades**. São Paulo: Editora Leitura e Arte, p.211-216, 2004.

MANSOURI, M.T. et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. **Food Chem**, v. 138, p. 1028–1033, 2013.

MARTIN-ARAGON, S.; BENEDI, J.M.; VILLAR, A.M. Effects of the antioxidant (6,7-dihydroxycoumarin) esculetin on the glutathine system and lipid peroxidation in mice. **Gerontology**, v. 44, p. 21-25, 1998.

MARTINS, F.S. et al. Expression of protein and mRNA encoding Insulin Growth Factor-I (IGF-I) in goat ovarian follicles and the influence of IGF-I on *in vitro* development and survival of caprine preantral follicles. **Anim Reprod**, v. 7, p. 349-361, 2010.

MATOS, M. H. T. et al. Effects of fibroblast growth factor-2 on the *in vitro* culture of caprine preantral follicles. **Cells Tissues Organs**, v. 186, 112-120, 2007a.

MATOS, M.H.T. et al. Técnicas para avaliação da qualidade de folículos ovarianos pré-antrais cultivados *in vitro*. **Revista Brasileira de Reprodução Animal.**, v.31,p. 433-442, 2007b.

MATSUDA, F. et al. Follicular growth and atresia in mammalian ovaries: regulation by survival and death of granulosa cells. **J Reprod Dev**, v. 58, p. 44-50, 2012.

MCLAUGHLIN, M.; TELFER, E.E. Oocyte development in bovine primordial follicles is promoted by activin and FSH within a two-step serum-free culture system. **Soc Reprod Fertil Suppl**, v. 139, p. 971-978, 2010.

MYLONIS, I. et al. The dietary flavonoid kaempferol effectively inhibits HIF-1 activity and hepatoma cancer cell viability under hypoxic conditions. **Biochem Biophys**, v. 398, p. 74-78, 2010.

NAIR, C.K.K.; SALVI, V.P. Protection of DNA from gamma-radiation induced strand breaks by Epicatechin. **Mutat Res Genet Toxicol Environ Mutagen**, v. 650, p. 48–54, 2008.

NILSSON, E.E. et al. Leukemia inhibitory factor (LIF) promotes the primordial to primary follicle transition in rat ovaries. **Mol Cell Endocrinol**, v.188, p.65-73, 2002.

O'BRIEN, M.J.; PENDOLA, J.K.; EPPIG, J.J. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. **Biol Reprod**, v. 68, p. 1682–1686, 2003.

OKTEM, O.; URMAN, B. Understanding follicle growth in vivo. **Hum Reprod**, v. 25, p. 2944-54, 2010.

OLSZANECKI, R. et al. Kaempferol, but not resveratrol inhibits angiotensin converting enzyme. **J Physiol Pharmacol**, v. 59, p. 387-392, 2008.

OTT, M. et al. The Mitochondrial TOM Complex Is Required for tBid/Bax-induced Cytochrome c Release. **J Biol Chem**, v. 282, p. 27633-27639, 2007.

OYAWOYE, O. et al. Antioxidants and reactive oxygen species in follicular fluid of women undergoing IVF: relationship to outcome. **Hum Reprod**, v. 18, p. 2270–2274, 2003.

PALMA, G. A. et al. Review Article: Biology and Biotechnology of Follicle Development. **Sci World J**, v. 14, p. 1-14, 2012.

PANICH, U. UVA-induced melanogenesis and modulation of glutathione redox system in different melanoma cell lines: The protective effect of gallic acid. **J Photochem Photobiol B**, v. 108, p.16–22, 2012.

PANNEERSELVAM, M. et al. Dark chocolate receptors: epicatechin-induced cardiac protection is dependent on opioid receptor stimulation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol**, v. 299, p. 1604–1609, 2010.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. **Endocrinology**, v. 140, p. 4262- 4271, 1999.

PARROTT, J.A.; SKINNER, M.K. Kit Ligand actions on ovarian stromal cells: effects on theca cell recruitment and steroid production. **Mol Reprod Dev**, v. 55, p. 55-64, 2000.

PENG, X. et al. In vitro culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culturemedium. **J Assist Reprod Genet**, v. 27, p. 247–57, 2010.

PEREIRA, M. S. **Manual técnico Conhecendo e produzindo sementes e mudas da caatinga**. Fortaleza: Associação Caatinga, 60 p, 2011.

PICTON, H.M. et al. The *in vitro* growth and maturation of follicles. **Reproduction**, v. 136, p. 703-715, 2008.

PUNITHAVATHI, V.R. et al. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. **Eur J Pharmacol**, v. 650, p. 465–71, 2011.

PYUN, J.H. et al. Epicatechin inhibits radiation-induced auditory cell death by suppression of reactive oxygen species generation. **Neuroscience**, v. 199, p. 410–420, 2011.

RACHID, M.A. et al. Apoptosis in the lymphoid depletion induced by T-2 toxin in broiler chicks. Histomorphometry of the bursa of Fabricius. **Arq Bras Med Vet Zoot**, v. 52, p. 6, 2000.

RAJENDRAN, P. et al. Kaempferol, a potential cytostatic and cure for inflammatory disorders. **Eur J Med Chem**, v. 86, p. 103-112, 2014.

RAMALHO-SANTOS, J. et al. Mitochondrial functionality in reproduction: From gonads and gametes to embryos and embryonic stem cells. **Hum Reprod Up**, v. 15, p. 553–572, 2009.

RAMIRO-PUIG E, CASTELL M. Cocoa: antioxidant and immunomodulator. **Br J Nutr**, v. 101, p. 931–940, 2009.

REDDY, P. et al. Oocyte-specific deletion of Pten causes premature activation of the primordial follicle pool. **Science**, v. 319, p. 611-613, 2008.

RICHARDS, J. S.; PANGAS, S. A. The ovary: basic biology and clinical implications. **J Clin Invest.**, v. 120, p. 963–972, 2010.

ROCHA, R.M.P. et al. Interaction between melatonin and follicle-stimulating hormone promotes in vitro development of caprine preantral follicles. **Domest Anim Endocrinol**, v. 44, p. 1-9, 2013.

RODRIGUES, G.Q. et al. Bovine serum albumin improves in vitro development of caprine preantral follicles. **Anim Reprod**, v. 7, p. 382-388, 2010.

ROSSETTO, R. et al. Interaction between ascorbic acid and follicle-stimulating hormone maintains follicular viability after long-term in vitro culture of caprine preantral follicles. **Domest Anim Endocrinol**, v. 37, p. 112–123, 2009.

ROSSETTO, R. **Efeito do fator de crescimento semelhante à insulina 1 (igf-i), meio de base, da insulina e fsh sobre o desenvolvimento *in vitro* de folículos pré-antrais bovinos isolados.** 2013. 121f. Tese (Doutorado em Ciências Veterinárias). Faculdade de Veterinária da Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

RUIJTERS, E.J. et al. The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. **Eur J Pharmacol** . v. 715, p.147–153, 2013.

RUIZ, E. et al. Kaempferol inhibits apoptosis in vascular smooth muscle induced by a component of oxidized LDL. **Eur J Pharmacol**, v. 529, p. 79-83, 2006.

SÁNCHEZ, F.; SMITZ, J. Molecular control of oogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1822, p. 1896-1912, 2012.

SANTOS, J. et al. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2 in the sheep ovary and its effects on pre-antral follicle apoptosis and development in vitro. **Reprod Dom Anim**, v.49, p. 522-228, 2014.

SARAIVA, M.V. et al. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown in vitro. **Reprod Sci**, v. 17, p. 1135-1143, 2010.

SCHUBERT, C. Mitochondrial DNA, Age, and the “Good” Embryo. **Biol Reprod**, v. 93, p. 54, 2015.

SERAFIM, M.K.B. et al. Canine preantral follicles cultured with various concentrations of follicle-stimulating hormone (FSH). **Theriogenology**, v. 74, p.749-755, 2010.

SHAILASREE, S. et al. Cytotoxic effect of p-coumaric acid on neuroblastoma, N2a cell via generation of reactive oxygen species leading to dysfunction of mitochondria inducing apoptosis and autophagy. **Mol Neurobiol**, v. 51, p. 119-130, 2014.

SHAKYA, G. et al. Hepatoprotective role of kaempferol during alcohol- and PUFA-induced oxidative stress, **J Basic Clin Physiol Pharmacol**, v. 24, p. 1-7, 2013.

SHIN H..A. et al. Radioprotective effect of epicatechin in cultured human fibroblasts and zebrafish. **J Radiat Research**, v. 55, p. 32–40, 2014.

SILVA, J.R.V. et al. Influences of FSH and EGF on primordial follicles during in vitro culture of caprine ovarian cortical tissue. **Theriogenology**, v. 61, p. 1691–1704, 2004.

SILVA, J.R.V. **Growth factors in goat ovaries and the role of activina-A in the development of early-staged follicles**. 2005. 142f. Phd Thesis. Utrecht University, Faculty of Veterinary Medicine, 2005.

SILVA, C.M.G. et al. Influência da tensão de oxigênio na maturação oocitária e cultivo *in vitro* de folículos e embriões. **Rev Bras Reprod Anim**, v. 34, p. 233-242, 2010.

SILVA, G. M. et al. Ascorbic acid improves the survival and *in vitro* growth of isolated caprine preantral follicles. **Anim Reprod**, v. 8, p. 14-24, 2011.

SILVA, C.M. et al. The effects of epidermal growth factor (EGF) on the in vitro development of isolated goat secondary follicles and the relative mRNA expression of EGF, EGF-R, FSH-R and P450 aromatase in cultured follicles. **Res Vet Sci**, v. 94, p. 453-61, 2012.

SILVA, E. et al. Antioxidant supplementation during in vitro culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice. **Reprod Fertil Dev**, v. 27, p. 975-983, 2015.

SILVEIRA, E.R.; PESSOA, O.D.L. **Constituintes micromoleculares de plantas do nordeste com potencial farmacológico: com dados de RMN 13C**. Fortaleza: Expressão Gráfica e Editora, 216p, 2005.

SINGH, U.P. et al. Investigation on the phenolics of some spices having

pharmacotherapeutic properties. **J Herb Pharmacother**, v.4, p. 27-42, 2004.

SKINNER MK. Regulation of primordial follicle assembly and development. **Hum Reprod Up**, v. 11, p. 461-471, 2005.

SOMERSET, S. M.; JOHANNOT, L. Dietary flavonoid sources in Australian adults. **Nutr Cancer**, v. 60, p. 442–449, 2008.

SONGSASEN, N.; SPINDLER, R. E.; WILDT, D. E. Requirement for, and patterns of, pyruvate and glutamine metabolism in the domestic dog oocyte in vitro. **Mol Reprod Dev**, v. 74, p. 870–877, 2007.

SOYAL, S.M., AMLEH, A., DEAN, J. FIGalpha, a germ cell-specific transcription factor required for ovarian follicle formation. **Development**. V. 127, p.4645–4654, 2000.

STEFFEN, Y. et al. Myeloperoxidase-mediated LDL oxidation and endothelial cell toxicity of oxidized LDL: attenuation by (–)-epicatechin. **Free Radic Res**, v. 40, p. 1076–1085, 2006.

TAGLER, D. et al. Supplemented α -MEM/F12-Based Medium Enables the Survival and Growth of Primary Ovarian Follicles Encapsulated in Alginate Hydrogels. **Biotechnol Bioeng**, v. 110, p. 3258-3268, 2013.

TALEBI, A , et al. The effect of alpha lipoic acid on the developmental competence of mouse isolated preantral follicles. **J Assist Reprod Genet**, V.29, P.175–183, 2012.

TANABE, K. et al. Epicatechin limits renal injury by mitochondrial protection in cisplatin nephropathy. **Am J Physiol Renal Physiol**, v. 303, p. 1264–1274, 2012.

TANABE, M. et al. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. **J Reprod Develop**, v. 61, p. 35–41, 2015.

TANG, K. et al. GDF-9 and bFGF enhance the effect of FSH on the survival, activation, and growth of cattle primordial follicles. **Anim Reprod Sci**, v. 131, p. 129–134, 2012.

TANG, X. et al. Protective Effect of Kaempferol on LPS plus ATP-Induced Inflammatory Response in Cardiac Fibroblasts-1. **Inflammation**, v. 38, p. 94-101, 2015.

TARAZONA, A. M. et al. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. **Reprod Dom Anim**, v. 41, p. 5-11, 2006.

TELFER, E. E. et al. A two-step serum-free culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. **Hum Reprod**, v. 23, p. 1151-1158, 2008.

- TIMME-LARAGY, A.R. et al. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. **Free Rad Biol Med**, v. 65, p. 89–101, 2013.
- UHM SJ, GUPTA MK, YANG JH, LEE SH, LEE HT. Selenium improves the developmental ability and reduces the apoptosis in porcine parthenotes. **Mol Reprod Dev**, v.74, p.1386-1394, 2007.
- VALDEZ, K.E.; CUNEO, S.P.; TURZILLO, A.M. Regulation of apoptosis in the atresia of dominant bovine follicles of the first follicular wave following ovulation. **Reproduction**, v. 130, p. 71-81, 2005.
- VAN DEN HURK, R. et al. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. **Human Reprod Up**, v. 4, p. 833-841, 1998.
- VAN DEN HURK, R.; ZHAO, J. Formation of mammalian oocytes and their growth, differentiation and maturation within ovarian follicles. **Theriogenology**. v. 63, p. 1717-1751, 2005.
- WANASUNDARA, U. et al. Isolation and Identification of an Antioxidative Component in Canola Meal. **J Agric Food Chem**, v. 42, p 1285–1290, 1994.
- WANG, Y. et al. Epidermal growth factor (EGF) receptor ligands in the chicken ovary. I. Evidence for eparinbinding EGF-like growth factor (HBEGF) as a potential oocyte-derived signal to control granulose cell proliferation and HB-EGF and kit ligand expression. **Endocrinol**, v. 148, p. 3426–3440, 2007.
- WANG, G. et al. High salt intake negatively impacts ovarian follicle development. **Ann Anat**, v. 200, p. 79–87, 2015.
- WHITE, Y.A.R. et al. Oocyte formation by mitotically active germ cells purified from ovaries of reproductive-age women. **Nat Med**, v. 18, p. 413–421, 2012.
- WOJDYLO, A.; OSZMIANSKI, J.; CZEMERYYS, R. Antioxidant activity and phenolic compounds in 32 selected herbs. **Food Chem**, v. 105, p. 940-949, 2007.
- WU J.; TIANG Q. Role of follicle stimulating hormone and epidermal growth factor in the development of porcine preantral follicle *in vitro*. **Zygote**, v. 15, p. 233–240, 2007.
- XU, M. et al. Tissue-Engineered Follicles Produce Live, Fertile Offspring. **Tissue Eng**, v. 12, p. 2739–2746, 2009.
- YIVGI-OHANA, N. et al. Utilizing mitochondrial events as biomarkers for imaging apoptosis. **Cell Death Dis**, v. 2, p.1-8, 2011.
- YUCEBILGIN, M.S. et al. Effect of chemotherapy on primordial follicular reserve of rat: an animal model of premature ovarian failure and infertility. **Aust N Z J Obstet Gynaecol**, v. 44, p. 6-9, 2004.

ZANG, L.Y. et al. Effect of antioxidant protection by *p*-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. **Am J Physiol Cell Physiol**, v. 279, p. 954–960, 2000.

ZHANG, Y. et al. Isolation and identification of strawberry phenolics with antioxidant and human cancer cell antiproliferative properties. **J Agric Food Chem.**, v. 56, p. 670–675, 2008.

ZOU, K. et al. Production of offspring from a germline stem cell line derived from neonatal ovaries. **Nat Cell Biol**, v. 11, p. 631-636, 2009.

ZUELKE, K.A. et al. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. **Mol Reprod Dev**, v. 64, p. 106–112, 2003.

ANEXO 1**Supplemented base medium containing *Amburana cearensis* associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles**

B. B. Gouveia¹, T. J. S. Macedo¹, J. M. S. Santos¹, R. S. Barberino¹, V. G. Menezes¹,
M. C. Müller¹, J. R. G. S. Almeida², J. R. Figueiredo³, M. H. T. Matos^{1*}

¹Nucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil; ²Center for Studies and Research on Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, 56304-205, Petrolina-PE, Brazil; ³Laboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary, State University of Ceará, Fortaleza-CE, Brazil

Submetido para publicação no periódico **Theriogenology**
(Qualis A2 na área de Medicina Veterinária)

THERIOGENOLOGY

Contact us
Help ?



Username: helena.matos@univast.edu.br
Switch To: Author

Go To: [MY EES HUB](#)

Maintenance outage on 31 January 2016 ... [more](#)
Maintenance outages until February 2016 ... [more](#)
"My EES Hub" available for consolidated users ... [more](#)

Version: [EES 2016.1](#)

Submissions Being Processed for Author **Helena TAVARES Matos, Ph.D.**

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

Action	Manuscript Number	Title	Initial Date Submitted	Status Date	Current Status
Action Links		Supplemented base medium containing Anburana cearenis associated with FSH improves in vitro development of isolated goat preantral follicles	29 Jan 2016	29 Jan 2016	Submitted to Journal

Page: 1 of 1 (1 total submissions)

Display 10 results per page.

<< Author Main Menu

SUPPLEMENTED BASE MEDIUM CONTAINING *AMBURANA CEARENSIS*
ASSOCIATED WITH FSH IMPROVES IN VITRO DEVELOPMENT OF ISOLATED
GOAT PREANTRAL FOLLICLES

B. B. Gouveia^a, T. J. S. Macedo^a, J. M. S. Santos^a, R. S. Barberino^a, V. G. Menezes^a,
M. C. Müller^a, J. R. G. S. Almeida^b, J. R. Figueiredo^c, M. H. T. Matos^{a*}

^aNucleus of Biotechnology Applied to Ovarian Follicle Development, Federal University of San Francisco Valley, 56300-990, Petrolina-PE, Brazil; ^bCenter for Studies and Research on Medicinal Plants, Federal University of San Francisco Valley, 56304-205, Petrolina-PE, Brazil; ^cLaboratory of Manipulation of Oocytes and Preantral Follicles (LAMOFOPA), Faculty of Veterinary, State University of Ceará,

Fortaleza-CE, Brazil

*Correspondence should be addressed to:

Universidade Federal do Vale do São Francisco (UNIVASF). Colegiado de Medicina Veterinária - Laboratório de Biologia Celular, Citologia e Histologia. Rodovia BR 407, Km 12, Lote 543 - Projeto de Irrigação Nilo Coelho - S/N, C1. CEP: 56300-990 - Petrolina - PE – Brasil. Tel.: +55.87.2101.4839.

Corresponding author: helena.matos@univasf.edu.br (M. H. T. Matos)

Abstract

The effects of *Amburana cearensis* ethanolic extract, with or without addition of a mix of supplements associated or not with FSH, on *in vitro* morphology and development of caprine secondary follicles were evaluated. In experiment 1, isolated follicles (250 μm in diameter) were cultured for 12 days in α -MEM alone (control) or into medium composed of different concentrations of *A. cearensis* extract (Amb 0.1; 0.2 or 0.4 mg/mL). In experiment 2, culture media were α -MEM or Amb 0.2 mg/mL (both without supplements) or those same media supplemented with BSA, insulin, transferrin, selenium, glutamine, hypoxanthine and ascorbic acid (referred as α -MEM⁺ and Amb 0.2⁺, respectively), or these last groups also supplemented with sequential FSH (100 ng/mL from day 0 to day 6; 500 ng/mL from day 6 to day 12), constituting groups α -MEM⁺ + FSH and Amb 0.2⁺ + FSH. At the end of culture in experiment 1, control medium (α -MEM) and Amb 0.2 mg/mL have higher percentages ($P < 0.05$) of morphologically normal follicles and percentage of fully grown oocytes, i.e., oocyte $> 110 \mu\text{m}$, compared to other *A. cearensis* extract concentrations. In experiment 2, all supplemented media showed higher percentage ($p < 0.05$) of normal follicles and antrum formation than non-supplemented media. In addition, follicles cultured in Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH showed an average increase in diameter higher ($P < 0.05$) than the other treatments. Oocytes cultured in both treatments supplemented with FSH showed greater GSH and active mitochondria levels than non-supplemented media, but similar to the other treatments. In conclusion, *A. cearensis* extract (0.2 mg/mL) added by supplements and FSH improves follicular growth. Therefore, it can be an alternative culture medium for goat preantral follicle development.

Keywords: Oocyte, Antioxidant, Medicinal Plant, GSH, Mitochondria

1. Introduction

In vitro ovarian follicle culture systems could be used to produce mature eggs, and subsequently embryos [1]. Follicle culture is extremely successful in mice, demonstrated by the production of live offspring [2], but has not yet been adapted successfully to human [3] and other species [4; 5]. One of the major obstacles is optimizing culture medium composition for small follicles.

Minimal Essential Medium alpha modified (α -MEM) has been the most commonly used medium for culture of oocytes and follicular cells in caprine [6] and ovine [7] species. The addition of supplements (energy substrates, antioxidants, hormones and/or growth factors) to α -MEM is necessary to enable acceptable rates of follicular viability and growth [8; 9; 10]. Among the supplements, Follicle-stimulating hormone (FSH) has been widely used in the in vitro culture of preantral follicles in several species, maintaining the viability, reducing the apoptosis and promoting the follicular growth [11; 12; 6].

In an attempt to reduce the costs of culture media, another potential alternative strategy for optimizing the in vitro follicle development is the use of medicinal plant extracts. *Amburana cearensis* (Allemão) A.C. Smith (Fabaceae) is a tree commonly found in Northeastern Brazil, where it is popularly known as “cumaru” [13], “amburana” or “amburana-de-cheiro” [14]. In folk medicine, extracts of this plant have been used for the treatment of a wide range of diseases including respiratory problems, influenza, cough, thrombosis, hypertension, inflammations and healing [15]. In a recent study performed by our team, *A. cearensis* ethanolic extract has been successfully used to preserve caprine ovarian tissue at 4°C for 6 h, maintaining the percentages of normal and apoptotic follicles similar to that observed in the control medium (MEM) [16]. Moreover, *A. cearensis* ethanolic extract can be used as a culture medium for ovine preantral follicles, maintaining follicular survival

and stimulating a higher growth of isolated secondary follicles than control medium (α -MEM⁺) [17]. Both studies used the same *A. cearensis* extract, in which the following compounds were identified: gallic acid, protocatechuic acid, epicatechin, *p*-coumaric acid and kaempferol [16]. These compounds can act as natural antioxidants, reducing the levels of reactive oxygen species (ROS) and DNA damage, modulating the expression of antioxidant enzymes, such as glutathione (GSH), and improving mitochondrial function in different cell types [18; 19; 20; 21].

As *in vitro* cultures of oocytes are maintained at higher oxygen atmosphere than the *in vivo* environment, leading to an increased level of ROS [22], it could be speculated that the natural antioxidants of *A. cearensis* would protect ovarian follicles from oxidative damage during *in vitro* culture. Thus, *A. cearensis* extract may be a useful and cheaper substitute for standard cell culture medium. However, there were no reports in which this extract has been used as a culture medium for goat ovarian follicles. Thus, the aim of the present study was to evaluate the effect of *A. cearensis* ethanolic extract on *in vitro* morphology and development of isolated caprine secondary follicles. Moreover, we studied if the addition of commonly used supplements (bovine serum albumin-BSA, insulin, transferrin, selenium, glutamine, hypoxanthine and ascorbic acid) in the absence or presence of FSH to *A. cearensis* extract would influence on development, apoptosis, intracellular GSH level and the presence of metabolically active mitochondria (indicative of intact cells – [23]) of caprine follicles.

2. Material and Methods

Unless indicated, supplements, hormone and chemicals used in the present study were purchased from Sigma Chemical Co. (St. Louis, MO, USA).

2.2.Plant material and extract preparation

Fresh leaves of *A. cearensis* were collected in Petrolina (09°23'55'' South and 38-40°30'03'' West, Pernambuco, Brazil), from the Caatinga biome, and characterized in a semi-arid climate, with average annual temperature of 26.4°C. A voucher specimen (5545) is deposited at the Herbário Vale do São Francisco (HVASF) of the Federal University of San Francisco Valley. The leaves were dried in an oven at 40°C and pulverized and extracted at room temperature with 95% ethanol (Vetec, Duque de Caxias-RJ, Brazil) for 72 h. The extract was dried at 45 °C using rotavapor and the yield was approximately of 10% obtaining the crude ethanolic extract of the leaves of *A. cearensis*, which was dissolved in 0.9% saline solution, corresponding to concentrations of 0.1; 0.2 or 0.4 mg/mL [16].

2.3.Source of ovarian tissue

Ovaries (n = 130) were collected at a local abattoir from 65 adult (1–3 years old) mixed-breed goats (*Capra hircus*). Immediately post-mortem, pairs of ovaries were washed once in 70% alcohol and then twice in minimum essential medium buffered with HEPES (MEM-HEPES) and supplemented with antibiotics (100 µg/mL penicillin and 100 µg/mL streptomycin). Next, the ovaries were transported within 1 h to the laboratory in tubes containing MEM-HEPES with antibiotics at 4°C [24].

2.4. Isolation, selection and in vitro culture of ovine secondary follicle

In the laboratory, the surrounding fatty tissues and ligaments were stripped from the ovaries; large antral follicles and corpora lutea were removed. Ovarian cortical slices (1–2 mm thick) were cut from the ovarian surface using a surgical blade under sterile conditions and subsequently placed in holding medium consisting of MEM-HEPES with antibiotics. Goat secondary follicles, approximately 250 μm in diameter without antral cavities, were visualized under a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon, Tokyo, Japan) and mechanically isolated by microdissection using 26-gauge (26 G) needles. These follicles were then transferred to 100 μL droplets containing basic culture medium for the evaluation of quality. Only follicles that displayed the following characteristics were selected for culture: an intact basement membrane, two or more layers of granulosa cells and a visible and healthy oocyte that was round and centrally located within the follicle, without any dark cytoplasm. Isolated follicles were pooled and then randomly allocated to the treatment groups, with approximately 45-50 follicles per group, depending on the experiment.

After selection, the follicles were individually cultured (one follicle per droplet) in 100 μL droplets of culture medium under mineral oil in Petri dishes (60 x 15 mm; Corning, Sarstedt, Newton, NC, USA). Incubation was conducted at 39°C and 5% CO_2 in air for 12 days. This work was divided into two experiments that occurred at different times, as shown in Figure 1.

2.5. Experiment 1

The basic control medium consisted of α -MEM (pH 7.2–7.4) without supplements. To verify the influence of the plant, the follicles (approximately, 45 follicles per treatment group) were randomly distributed in α -MEM (control medium) or into medium composed of different concentrations of *A. cearensis* extract (Amb 0.1; 0.2 or 0.4 mg/mL; pH 7.2-7.4). In

all the treatments 60 μ L of the culture media was replaced with fresh media in each droplet every 2 days.

The morphological aspects of all preantral follicles were assessed every 6 days using a pre-calibrated ocular micrometer in a stereomicroscope (SMZ 645 Nikon) at 100x magnification. Only those follicles showing an intact basement membrane, with bright and homogeneous granulosa cells and an absence of morphological signs of degeneration were classified as morphologically normal follicles. Follicular atresia was recognized when a darkening of the oocytes and surrounding cumulus cells, misshapen oocytes or decreased follicle diameter was noted. The rupture of the basement membrane was also observed and characterized as oocyte extrusion. The following characteristics were analyzed in the morphologically normal follicles: (i) antral cavity formation, defined as the emergence of a visible translucent cavity within the granulosa cell layers, (ii) the diameter of healthy follicles, measured from the basement membrane, which included two perpendicular measures of each follicle, and (iii) the increase in the diameter, and (iv) the daily growth rate, calculated as the diameter of normal follicles at day 12 minus the diameter of follicles at day 0 divided by the days of in vitro culture (12 days).

After 12 days of culture, all of the healthy follicles were carefully and mechanically opened with 26 G needles under a stereomicroscope for oocyte recovery. The percentage of fully grown oocytes, i.e., oocyte $>110 \mu\text{m}$, was calculated as the number of acceptable quality oocytes ($\geq 110 \mu\text{m}$) recovered out of the total number of cultured follicles ($\times 100$).

2.6.Experiment 2

To evaluate the effectiveness of adding supplements to the culture medium, secondary follicles (approximately, 50 follicles per treatment group) were randomly distributed in the following treatments: α -MEM (control medium) and Amb 0.2 mg/mL (best results in the first experiment), both without supplements, or those same media supplemented with 3.0 mg/mL

bovine serum albumin (BSA), 10 ng/mL insulin, 5.5 µg/mL transferrin, 5.0 ng/mL selenium, 2 mM glutamine, 2 mM hypoxanthine and 50 µg/ml ascorbic acid. These media were referred as α -MEM⁺ and Amb 0.2⁺, respectively. In addition, these last groups were further supplemented with human recombinant FSH (Gonal-F®; Serono Laboratórios, São Paulo, Brazil) in increasing concentrations (Sequential FSH: from day 0 to day 6 = 100 ng/mL; from day 6 to day 12 = 500 ng/mL, according to [6]), constituting groups α -MEM⁺ + FSH and Amb 0.2⁺ + FSH. Every other day, 60 µL of the culture media was replaced with fresh media in each droplet. In all the FSH treatments, a change of the complete volume (100 µL) of the medium was performed every 6 days.

As described for experiment 1, every 6 days of culture, the follicles were assessed for morphological aspects (morphologically normal follicles, oocyte extrusion, antral cavity formation, diameter, increase in the diameter, daily growth rate and percentage of fully grown oocytes). Furthermore, healthy oocytes retrieved from the experiment 2 were evaluated for apoptosis rates, intracellular GSH levels and mitochondrial activity.

2.7.Detection of apoptotic cells by TUNEL Assay

To assess DNA fragmentation and apoptosis, at the end of culture, oocytes were subjected to the TUNEL assay as previously described [25]. Briefly, oocytes were fixed in 4% paraformaldehyde solution for 1 h at room temperature. Then, oocytes (approximately, 10 oocytes per treatment group) were washed three times in solution of PBS/PVP and stored at 4°C in eppendorf with PBS/PVP until the beginning of TUNEL procedure. Therefore, oocytes were incubated in droplets of 100 µL of permeabilizing solution [0.1% (v/v) Triton X-100 in 10 mM PBS] for 3 h at room temperature. Positive and negative controls were incubated in drops of 100 µL containing DNase free RNase (Invitrogen Corporation, Carlsbad, CA, USA)

at 37°C for 1 h and washed 3 times in drops of PBS/PVP. The TUNEL assay was prepared as indicated by the manufacturer (In Situ Cell Detection Kit, Fluorescein: Boehringer Mannheim/Roche Diagnostics Ltd., Indianapolis, USA). To this end, 12.5 µL DTT enzyme and 112.5 µL of marker solution of 2-deoxyuridine triphosphate 5-FITC - FITC-dUTP were made to obtain 125 µL of TUNEL mixture for reaction. The experimental groups and the positive control were incubated with 15 µL of this solution for 1 h at 37°C in a moist chamber in the dark. The negative control was incubated at 15 µL with the marker solution. Oocytes were washed 3 times in drops of PBS/PVP and incubated in drops of PBS containing 10 mM Hoechst 33342 for 15 minutes at room temperature in the dark. Then, oocytes were washed in drops of PBS/PVP and slides were prepared for evaluation using an epifluorescence microscope (Nikon E200, Tokyo, Japan) at a magnification of x400. Oocytes were considered apoptotic when they have marked chromatin green fluorescence.

2.8.Measurement of intracellular GSH levels and metabolically active mitochondria

After culture, the oocytes were recovered and intracellular GSH levels and mitochondrial activity were measured as previously described [26, 27], with minor modifications. Briefly, 4-chloromethyl-6.8-difluoro-7-hydroxycoumarin (CellTracker® Blue; CMF2HC; Invitrogen) and MitoTracker Red (MitoTracker® Red, CMXRos, Molecular Probes, Melbourne, Victoria, Australia) were used to detect intracellular GSH and mitochondrial activity levels as blue and red fluorescence, respectively. Oocytes (approximately, 10 oocytes per treatment group) were incubated (in the dark) for 30 minutes in PBS supplemented with 10 mM of CellTracker Blue and 100 nM MitoTracker Red at 37 °C. After incubation, the oocytes were washed with PBS and the fluorescence was observed under an epifluorescence microscope with UV filters (370 nm for GSH and 579-599 nm for

active mitochondria). Fluorescent images were saved as image TIFF format and the fluorescence intensities of oocytes were analyzed using Image J software (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA).

2.9. Statistical analysis

Data from follicle survival, extruded follicles, antrum formation and retrieval of grown oocytes after *in vitro* culture were expressed as percentages and compared by the Chi-squared test. Data from GSH, mitochondrial activity, follicular diameter, increase in the diameter and growth rate were submitted to the Shapiro-Wilk test to verify normal distribution of residues and homogeneity of variances. Then, Kruskal-Wallis non-parametric test was used for comparisons. When main effects or interactions were significant, means were compared by test Student Newman Keuls. Data from apoptotic cells (TUNEL) were submitted to PLSD Fisher test and expressed as percentage. The results were expressed as the means \pm standard error mean (SEM), and differences were considered significant when $P < 0.05$.

3. Results

3.1. Experiment 1

3.1.1. Follicular morphology and development after *in vitro* culture

Morphologically normal follicles showed centrally located oocytes and normal granulosa cells, which were enclosed by an intact basement membrane (Fig. 2A). As early as day 6 of the culture, a small antral cavity (Fig. 2B) and atretic follicles (Fig. 2C) could be observed in all the treatments. No extruded follicles were observed in the experiment 1.

The percentage of morphologically normal follicles decreased significantly from day 0 to day 12 in all the treatments (Fig. 3A). However, irrespective of culture time, the percentages of normal follicles were similar ($P > 0.05$) between control medium (α -MEM) and all concentrations of *A. cearensis* extract. At day 12 of culture, follicular survival was significantly higher in 0.2 mg/mL *A. cearensis* treatment than the other *A. cearensis* concentration treatments.

All the treatments induced a significant increase in the rates of antral cavity formation from day 0 to day 6, except in 0.1 mg/mL *A. cearensis* treatment (Fig. 3B). At the end of culture, antrum formation was higher in both α -MEM and 0.2 mg/mL *A. cearensis* treatments than 0.1 mg/mL *A. cearensis* treatment ($P < 0.05$). At day 12 of culture, follicles cultured in 0.4 mg/mL *A. cearensis* treatment had greater diameter than the other treatments ($P < 0.05$; Fig. 3C) except compared to 0.2 mg/mL *A. cearensis* treatment. However, there were no significant differences either in the daily growth rate (Figure 3D) or in the average increase in diameter (6.4 μm for the control; 6.0 μm for Amb 0.1; 13.1 μm for Amb 0.2, and 11.3 μm for Amb 0.4 mg/mL) among treatments. At the end of culture, the percentage of oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$ was similar ($P > 0.05$) between control and 0.2 mg/mL *A. cearensis* treatments, being both significantly higher than the other treatments (Tab. 1).

3.2.Experiment 2

3.2.1. Follicular morphology and development after in vitro culture

Based on the results described above (experiment 1), we evaluated the effectiveness of adding a mix of supplements alone or associated with increasing FSH concentrations in the control medium (α -MEM) and in medium composed of *A. cearensis* extract at a concentration

of 0.2 mg/mL on the follicle development *in vitro*. Figure 2 shows caprine ovarian follicles before (Fig. 2D) and after *in vitro* culture in experiment 2, being possible to observe, from day 6 onwards, antral cavity formation in all the treatments (Fig. 2E) and extruded follicles only in medium containing FSH (Fig. 2F).

The percentage of morphologically normal follicles in experiment 2 decreased significantly from day 0 to day 12 in all the treatments (Fig. 4A). At the end of culture, there was no significant difference ($P > 0.05$) in the percentage of morphologically normal follicles among all supplemented media, including treatments with FSH. In addition, these media have more normal follicles ($P < 0.05$) than both base media without supplements.

The rate of antrum formation at day 12 of culture was significantly higher in both base media supplemented with FSH than non-supplemented media (α -MEM and 0.2 mg/mL *A. cearensis* extract), and similar ($P > 0.05$) to the other supplemented media (Fig. 4B). Follicular diameter did not differ ($P > 0.05$) among the treatments after 12 days of culture (Fig. 4C). However, supplementation of *A. cearensis* with FSH (Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH) showed daily growth rates similar ($P > 0.05$) to Amb 0.2⁺ mg/mL and significantly higher than the other treatments (Fig. 4D). Moreover, follicles cultured in medium composed of 0.2 mg/mL *A. cearensis* + FSH showed an average increase in diameter significantly higher than the other treatments (6.6 μ m for the control; 11 μ m for Amb 0.2 mg/mL; 6.2 μ m for α -MEM⁺; 14.6 μ m for Amb 0.2⁺ mg/mL; 10.8 μ m for α -MEM⁺ + FSH, and 23.4 μ m for Amb 0.2⁺ mg/mL + FSH). At the end of culture, the percentage of oocytes $\geq 110 \mu$ m was significantly higher in both treatments supplemented with sequential FSH than in α -MEM and Amb 0.2 (both without supplements), but similar ($P > 0.05$) to the other supplemented treatments (Tab. 2).

3.2.2. Oocyte apoptosis detection after in vitro culture by TUNEL assay

The TUNEL assay revealed the absence or very few apoptotic oocytes after 12 days of culture (Fig. 5A). All oocytes were apoptotic in the positive control (Fig. 5B) and negative control did not show marking for TUNEL analysis (Fig. 5C). All oocytes show marking chromatin with Hoechst 33342 in blue fluorescence (Fig. 5D-F). No differences ($P > 0.05$) on TUNEL-positive oocytes were observed among treatments (data not shown).

3.2.3. Intracellular GSH levels and active mitochondria

Oocytes cultured in both treatments supplemented with sequential FSH showed greater level of intracellular GSH ($P < 0.05$) than α -MEM and Amb 0.2 mg/mL (both without supplements), and similar ($P > 0.05$) to the other treatments (Fig. 6). Similar results were observed for the mitochondrial activity (Fig. 7).

4. Discussion

This study is the first report evaluating the effects of *A. cearensis* extract on the *in vitro* culture of caprine ovarian follicles. In experiment 1, supplements were not added to the medium to verify if the plant extract alone would influence follicle morphology and development. After 12 days of culture, control medium (α -MEM) and the medium composed of 0.2 mg/ml *A. cearensis* extract, both without supplements, have similar percentages of morphologically normal follicles, antrum formation and oocyte recovery.

We have already shown that the ethanolic extract of *A. cearensis*, which was the same used in the current work, contains gallic acid, protocatechuic acid, epicatechin, *p*-coumaric acid and kaempferol [16]. Gallic acid and protocatechuic acid (PCA), endogenous plant phenol found in large amounts in the *A. cearensis* extract, have been studied due to their antioxidant, cardioprotective and anti-cancer potential [28; 29]. Evidence from rat models suggests that gallic acid has neuroprotective activity against 6-hydroxydopamine-induced oxidative stress via enhancement of glutathione peroxidase (GPx) levels [30], and PCA reduces neuronal apoptosis *in vitro*, through the reduction of ROS and increase of antioxidant enzymes such as catalase (CAT) [31]. The flavonoids epicatechin, kaempferol and *p*-coumaric acid act directly on eliminating ROS through the action of several enzymes (CAT, GSH, GPx), thus, reducing DNA damage in different cell types [32; 33; 34]. Therefore, in our study, it can be suggested that these natural antioxidants may act isolated or in association to support the survival and promote development of caprine preantral follicles cultured in 0.2 mg/mL *A. cearensis* similarly to α -MEM, which is a commercial medium, containing non-essential amino acids, carbohydrates, sodium pyruvate, lipoic acid, biotin, vitamins and DNA precursors [35]. In addition, in the present study, the percentage of normal follicles and the rate of oocytes $\geq 110 \mu\text{m}$ was higher in 0.2 mg/mL *A. cearensis* compared to other plant concentrations. It is possible that 0.1 mg/mL *A. cearensis* may not be sufficient for the maintenance of follicular survival and that a higher concentration (0.4 mg/mL) may have potentiated the cytotoxic effect of some compounds, such as *p*-coumaric acid, that showed cytotoxic effect on neuroblastoma after 72 h of treatment, promoting an increase in ROS levels [36].

We further hypothesized that viability might be affected by either mix supplements (BSA, insulin, transferrin, selenium, glutamine, hypoxanthine and ascorbic acid) or FSH, and that the growth rates of follicles cultured in a supplemented medium, especially in *A.*

cearensis extract, would be higher than those of non-supplemented medium. This hypothesis was confirmed in experiment 2. At the end of culture, all supplemented media showed higher percentage of normal follicles than non-supplemented media. Previous studies have also shown that addition of supplements into the base culture medium could maintain ovarian follicle viability [37; 38], especially due to the antioxidant potential (ascorbic acid, selenium and transferrin) or to the action as energy substrates (glutamine and BSA) for follicular cells [39; 8; 9]. Some authors showed that defined concentrations of bovine recombinant FSH, added in specific moments of the culture and in a progressive way, preserve caprine follicle survival [12], compared to supplemented control medium. In contrast, we did not see any difference among supplemented media (with or without FSH). These differences in results could be to different sources of FSH used (bovine x human). Furthermore, a longer culture period would be needed to observe a significant change in follicular viability or antral cavity formation in FSH-free medium.

The average increase in diameter was maximum at a combination of supplements together with sequential FSH in the *A. cearensis* medium. It is known that after antrum formation, the follicle become gonadotrophin-dependent [40], suggesting that the use of FSH may be necessary to give a large support to follicle growth. Moreover, we have recently showed that *A. cearensis* extract promotes the development of ovine isolated secondary follicles in vitro [17]. Therefore, it could be thought that any compound of the *A. cearensis* extract (e.g. PCA stimulated rat neural stem cells proliferation in vitro – [41]) may interact with the supplements and FSH, stimulating the rates of caprine follicle growth.

Finally, we observed that media containing both supplements and FSH enhanced follicular levels of GSH and active mitochondria, compared to non-supplemented media. These parameters are related to the fertilizing potential and developmental capacity of oocytes [42; 43]. GSH is an endogenous antioxidant and may play an important role in DNA and

protein synthesis, cellular protection during oxidative stress, and cell proliferation during embryonic events [44; 45]. Mitochondria are directly involved at several levels in the reproductive process since their functional status influences the quality of oocytes and contributes to the process of fertilization and embryonic development [46], and part of the antioxidant defense are formed in the mitochondria [47]. Moreover, low mitochondrial activity would seem to be a feature of bovine oocytes that have not undergone significant maturation [48]. Thus, our results provide evidence that addition of supplements and FSH to the medium is important to ensure follicular growth and protection against oxidative stress due its ability to increase GSH (probably decreasing ROS) and mitochondrial activity. This could be one of the facts related to the very few apoptotic oocytes found after culture.

In conclusion, this study showed that *A. cearensis* extract (0.2 mg/mL) added by supplements and FSH improves follicle growth, GSH levels and mitochondrial activity. This extract can be a cheap (about 40 times less than α -MEM) and efficient alternative base culture medium for preantral follicle development. Further studies are needed to mature in vitro grown oocytes for fertilization techniques.

5. Acknowledgements

This work is part of an associated project of the Artificial Ovary Network, supported by CNPq (407335/2013-7). B. B. Gouveia receives a scholarship from the Fundação de Amparo à Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (FACEPE, Brazil). J. R. G. S. Almeida, J. R. Figueiredo and M. H. T. Matos are supported by a grant from CNPq.

6. References

- [1] Tagler D, Makanji Y, Anderson NR, Woodruff TK, Shea LD. Supplemented aMEM/F12-Based Medium Enables the Survival and Growth of Primary Ovarian Follicles Encapsulated in Alginate Hydrogels. *Biotechnology and Bioengineering*, 2013; 110 (12) 3258-3268.
- [2] O'Brien MJ, Pendola JK, Eppig JJ. A revised protocol for *in vitro* development of mouse oocytes from primordial follicles dramatically improves their developmental competence. *Biol Reprod*; 2003; 68:1682– 1686.
- [3] Telfer, EE.; Mclaughlin, M; Ding, C; Thong, K J. A two-step serumfree culture system supports development of human oocytes from primordial follicles in the presence of activin. *Hum Reprod*, 2008; 23: 1151-1158.
- [4] Arunakumari, G; Shanmugasundaram N; Rao, VH. Development of morulae from the oocytes of cultured sheep preantral follicles. *Theriogenology*. 2010;74:884-94.
- [5] Magalhães, DM.; Duarte, ABG.; Araújo, VR; Brito, IR.; Soares, TG; Lima, IMT.; Lopes, CAP.; Campello, CC.; Rodrigues, APR.; Figueiredo, J. R. *In vitro* production of a caprine embryo from a preantral follicle cultured in media supplemented with growth hormone. *Theriogenology*, 2011; 75 (1):182-188.
- [6] Barros, VRP., Cavalcante, AYP., Macedo, TJS., Barberino, RS., Lins, TBL., Gouveia, B.B., Menezes, VG., Queiroz, MA., Araujo, VR., Palheta, Jr , RC., Leite, MCP., Matos, M.H.T. Immunolocalization of Melatonin and Follicle-Stimulating Hormone Receptors in Caprine Ovaries and their Effects During *in vitro* Development of Isolated Pre-Antral Follicles. *Reprod Dom Anim*. 2013; 48:1025–1033.
- [7] Esmailzadeh, F, Hosseini, SM, Nasiri, Z, Hajian, M, Chamani, M, Gourabi, H, Shahverdi, AH, Vosough, AD, Nasr-Esfahani, MH,. Kit ligand and glial-derived neurotrophic

factor as alternative supplements for activation and development of ovine preantral follicles in vitro. *Mol. Reprod. Dev.* 2013; 80, 35–47.

[8] Abedelahi, A.; Salehnia, M.; Allameh, AA.; Davoodi, D. Sodium selenite improves the *in vitro* follicular development by reducing the reactive oxygen species level and increasing the total antioxidant capacity and glutathione peroxide activity. *Hum Reprod*, 2010; 25 : 977–985.

[9] Rodrigues, GQ.; Silva, CMG.; Faustino, LR.; Bruno, JB.; Magalhães, DM.; Campello, C.C.; Figueiredo, J.R. Bovine serum albumin improves *in vitro* development of caprine preantral follicles. *Animal Reproduction*, 2010; 7: 382-388.

[10] Santos J. et al. Immunohistochemical localization of fibroblast growth factor-2 in the sheep ovary and its effects on pre-antral follicle apoptosis and development in vitro. *Reproduction in Domestic Animals*. 2014; 49:522-228.

[11] Gutierrez, CG.; Ralph, JH.; Telfer, EE.; Wilmut, I.; Webb, R. Growth and antrum formation of bovine preantral follicles in long-term culture *in vitro*. *Biology of Reproduction*. 2000; 62:1322-1328.

[12] Saraiva, MV., Rossetto, R., Brito, IR., Celestino, JJ., Silva, CM., Faustino, LR., Almeida, AP., Bruno, JB., Magalhães, DM., Matos, MH., Campello, CC., and Figueiredo, JR. Dynamic medium produces caprine embryo from preantral follicles grown *in vitro*. *Reprod. Sci.* 2010; 17::1135-1143.

[13] Dantas ANS., Araujo AC. Pacheco, AGM. , Branco A. SangioniI L.A., Almeida J.R.G.S., Horta M.C. **Acaricidal activity of *Amburana cearensis* on the cattletick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus***. *Ciência Rural*, Santa Maria, 2015; 46(3):.536-541.

[14] Leal LKAM, Pierdoná TM, Góes JGS, Fonsêca KS, Canuto KM, Silveira ER, Bezerra AME, Viana GSB. A comparative chemical and pharmacological study of standardized

extracts and vanillic acid from wild and cultivated *Amburana cearensis* A.C. Smith. *Phytomedicine*, 2011; 181:230-233.

[15] Cartaxo, SL., Souza, MMA, Albuquerque, U.P. Medicinal plants with bioprospecting potential used in semi-arid northeastern Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 2010; 131: 326–342.

[16] Gouveia, BB, Barros, VRP, Gonçalves, RJS., Barberino, RS., Menezes, VG., Lins, TLB, Macedo, TJS., Santos, JMS, Rolim, LA., Rolim Neto, P.J., Almeida, J.R.G.S, Matos, M.H.T. Effect of ovarian tissue transportation in *Amburana cearensis* extract on the morphology and apoptosis of goat preantral follicles. *Anim. Reprod.*, Belo Horizonte, 2015; 12 (2):316-323.

[17] Barberino, RS. Et Al. *Amburana cearensis* leaf extract maintains survival and promotes *in vitro* development of ovine secondary follicles. *Zygote*. 2015. 1-9.

[18] Leal LKAM, Nobre Júnior HV, Cunha GMA, Moraes MO, Pessoa C, Oliveira RA, Silveira, ER, Canuto KM, Viana GSB. Amburoside A, a glucoside from *Amburana cearensis*, protects 27 mesencephalic cells against 6-hydroxydopamine-induced neurotoxicity. *Neurosci Lett*, 2005;388:86-90.

[19] Ruijters EJ, Weseler AR, Kicken C, Haenen GR, Bast A. The flavanol (-)-epicatechin and its metabolites protect against oxidative stress in primary endothelial cells via a direct antioxidant effect. *Eur J Pharmacol* . 2013; 715: 147–153.

[20] Kim, YS., Seo, HW., Lee, MH., Kim, DK., Jeon, H. & Cha, D.S. Protocatechuic acid extends lifespan and increases stress resistance in *Caenorhabditis elegans*. *Arch. Pharm. Res.* 2014, 37: 245–52.

[21] Silva, E.; Greene, A.F., Strauss, K., Herrick, J.R., Schoolcraft, W.B. And Krisher, R.L. Antioxidant supplementation during *in vitro* culture improves mitochondrial function and development of embryos from aged female mice. *Reprod. Fertil. Dev.* 2015, 27: 975-983.

- [22] Wang, Y., Li, J., Wang, CY., Kwok, AHY., Leung, FC. Epidermal growth factor (EGF) receptor ligands in the chicken ovary. I. Evidence for eparinbinding EGF-like growth factor (HBEGF) as a potential oocyte-derived signal to control granulosa cell proliferation and HB-EGF and kit ligand expression. *Endocrinol* 2007; 148: 3426–3440.
- [23] Van den Hurk, R., Spek, ER., Hage, WJ., Fair, T., Ralph, JH., Schotanus, K. Ultrastructure and viability of isolated bovine preantral follicles. *Human Reproduction Update*, 1998; (4): 833-841.
- [24] Chaves RN, Martins FS, Saraiva MVA, Celestino JJH, Lopes CAP, Correia JC, Matos MHT, Bão SN, Name KPO, Campello CC, Silva JRV, Figueiredo JR. Chilling ovarian fragments during transportation improves viability and growth of goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Reprod Fertil Dev*, 2008, 20: 640-647.
- [25] Li HJ, Liu DJ, Cang M, Wang LM, Jin MZ, Ma YZ, Shorgan B. Early apoptosis is associated with improved developmental potential in bovine oocytes. *Animal Reproduction Science*. 2009, 114: 89–98.
- [26] Kwak SS, Cheong SA, Jeon Y, Lee E, Choi KC, Jeung EB, Hyun SH,. The effects of resveratrol on porcine oocyte in vitro maturation and subsequent embryonic development after parthenogenetic activation and in vitro fertilization. *Theriogenology*. 2012, 78: 86–101.
- [27] Tanabe, M. et al. Melatonin protects the integrity of granulosa cells by reducing oxidative stress in nuclei, mitochondria, and plasma membranes in mice. *Journal of Reproduction and Development*, 2015.61(1): 35–41.
- [28] Punithavathi, VR., Prince, PSM., Kumar, R. & Selvakumari, S. Antihyperglycaemic, antilipid peroxidative and antioxidant effects of gallic acid on streptozotocin induced diabetic Wistar rats. *Eur. J. Pharmacol*. 2011; 650: 465–71.

- [29] Kakkar, S.; Bais, S. A Review on Protocatechuic Acid and Its Pharmacological Potential. *ISRN Pharmacol.*, 2014, 2014: 1-9.
- [30] Mansouri, MT. et al. Neuroprotective effects of oral gallic acid against oxidative stress induced by 6-hydroxydopamine in rats. *Food Chemistry*. 2013; 138: 1028–1033.
- [31] Guan, S. et al. Protocatechuic acid promotes the neuronal differentiation and facilitates survival of phenotypes differentiated from cultured neural stem and progenitor cells. *Eur. J. Pharmacol.*, 2011, 670: 471-478.
- [32] Zang, LY., Greg C., Gardner H., Shi X., Castranova V., Vallyathan V.. Effect of antioxidante protection by *p*-coumaric acid on low-density lipoprotein cholesterol oxidation. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2000; 279: C954–C960.
- [33] Shakya, G.; Manjini, S.; Hoda, M.; Rajagopalan, R. Hepatoprotective role of kaempferol during alcohol- and PUFA-induced oxidative stress, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol*. 2013, 24: 1-7.
- [34] Shin HA., Shin YS., Kang SU., Kim JH., Oh YT., Park KH., Lee BH., Kimc.H. Radioprotective effect of epicatechin in cultured human fibroblasts and zebrafish. *Journal of Radiation Research*, 2014, 55: 32–40.
- [35] Faustino LR, Lima IMT, Carvalho AA, Silva CMG, Castro SV, Lobo CH, Lucci CM, Campello CC, Figueiredo JR, Rodrigues APR. Interaction between keratinocyte growth factor-1 and kitligand on the goat preantral follicles cultured *in vitro*. *Small Rumin Res*, 2013, 114:112-119.
- [36] Shailasree S., Venkataramana M., Niranjana S. R, Prakash HS. Cytotoxic effect of *p*-coumaric acid on neuroblastoma, N2a cell via generation of reactive oxygen species leading to dysfunction of mitochondria inducing apoptosis and autophagy. *Mol Neurobiol*. 2014 doi: 10.1007/s12035-014-8700-2.

- [37] Silva, JRV.; Van Den Hurk, R.; Van Tol, HTA.; Roelen, BAJ.; Figueiredo, JR. Gene expression and protein localisation for activin-A, follistatin and activin receptors in goat ovaries. *J. Endocrinol.* 2004; 183: 405–415.
- [38] Peng, X., Yang, M., Wang, L., Tong, C. & Guo, Z. *In vitro* culture of sheep lamb ovarian cortical tissue in a sequential culture medium. *J. Assist. Reprod. Genet.* 2010, 27: 247–57.
- [39] Songsasen, N., Spindler, RE. & Wildt, DE. Requirement for, and patterns of, pyruvate and glutamine metabolism in the domestic dog oocyte *in vitro*. *Mol. Reprod. Dev.* 2007, 74: 870–7.
- [40] Erickson GF, Shimasaki S, The physiology of folliculogenesis: the role of novel growth factors. *Fertil Steril*, 2001, 76: 5.
- [41] Guan S, Ge D, Liu TQ, Ma X, Cui ZF. Protocatechuic acid promotes cell proliferation and reduces basal apoptosis in cultured neural stem cells. *Toxicol In Vitro*; 2009; 23: 201–8.
- [42] Zuelke KA, Jeffay SC, Zucker RM, Perreault SD. Glutathione (GSH) concentrations vary with the cell cycle in maturing hamster oocytes, zygotes, and pre-implantation stage embryos. *Mol Reprod Dev* 2003, 64: 106–112.
- [43] Castaneda CA, Kaye P, Pantaleon M, Phillips N, Fry R, D’Occhio MJ. Circulating concentrations of leptin, ovarian follicle number, and oocyte lipid content and active mitochondria, in Zebu crossbred cows maintained on standard or improved nutrition. *Anim Reprod Sci.* 2013, 140: 7–13.
- [44] García-Giménez JL, Markovic J, Dasí F, Queval G, Schnaubelt D, Foyer CH, Pallardó FV, Nuclear glutathione. *Biochim Biophys Acta.* 2013, 1830: 3304– 3316.

- [45] Timme-Laragy AR, Goldstone JV, Imhoff BR, Stegeman JJ, Hahn ME, Hansen JM. Glutathione redox dynamics and expression of glutathione-related genes in the developing embryo. *Free Rad Biol Med.* 2013. 65: 89–101.
- [46] Dumollard, R., Duchen, M., And Carroll, J. The role of mitochondrial function in the oocyte and embryo. **Curr. Top. Dev. Biol.** 2007, 77: 21–49.
- [47] Dumollard, R., Carroll, J., Duchen, M. R., Campbell, K., and Swann, K. Mitochondrial function and redox state in mammalian embryos. **Semin. Cell Dev. Biol.** 2009, 20: 346–353.
- [48] Tarazona A M, Rodriguez J I, Restrepo L F, Olivera-Angel M. Mitochondrial activity, distribution and segregation in bovine oocytes and in embryos produced *in vitro*. *Reproduction in Domestic Animals*, 2006 **41**: 5-11.

Table

Table 1. Percentage of fully grown oocytes (>110 μm) after 12 days of culture of caprine preantral follicles in the control (α -MEM) or different concentrations of *A. cearensis* extract without supplements (Experiment 1).

Treatments	% fully grown oocytes
α -MEM	42.22 (19/45) A
Amb 0.1	16.20 (7/45) B
Amb 0.2	30.95 (14/45) A
Amb 0.4	7.50 (3/45) B

(^{A,B}) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

Table 2. Percentage of fully grown oocytes (>110 μm) after 12 days of culture of caprine preantral follicles in α -MEM or 0.2 mg/mL *Amburana cearensis* extract, both in the absence or presence of supplements or FSH (Experiment 2).

Treatments	% fully grown oocytes
α -MEM	26.0 (13/50) A
Amb 0.2	20.0 (10/50) A
α -MEM ⁺	36.0 (18/50) AB
Amb 0.2 ⁺	30.0 (15/50) AB
α -MEM ⁺ +FSH	44.0 (22/50) B
Amb 0.2 ⁺ +FSH	42.5 (21/50) B

(^{A,B}) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

Figure captions

Figure 1 - General experimental protocol for *in vitro* culture of caprine secondary follicles in different media.

Figure 2 - Morphologically normal secondary follicle at day 0 (A and D), antral (B and E), atretic (C) and extruded (F) follicle after 6 days of culture. Experiment 1: A-C; Experiment 2: D-F. GC: granulosa cell; O: oocyte. Arrow: antral cavity. Scale bar: 250 μm ($\times 100$ magnification).

Figure 3 - Experiment 1: Percentages of morphologically normal follicles (A), antrum formation (B), follicular diameter (C) and daily growth rate (D) in α -MEM or different concentrations of *Amburana cearensis* extract (Amb 0.1; 0.2 and Amb 0.4).

(^{A,B,C}) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$); (^{a,b,c}) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ($P < 0.05$).

Figure 4 - Experiment 2: Percentages of morphologically normal follicles (A), antrum formation (B), follicular diameter (C) and daily growth rate (D) in α -MEM or *Amburana cearensis* extract (0.2 mg/mL), both in the absence or presence of supplements and/or FSH.

(^{A,B,C}) Different letters denote significant differences among treatments in the same period ($P < 0.05$); (^{a,b,c}) Different letters denote significant differences among culture periods in the same treatment ($P < 0.05$).

Figure 5 - Representative DNA fragmentation of caprine oocytes after 12 days of culture. Normal preantral follicle in 0.2 mg/mL *A. cearensis* (A and D), apoptotic follicle in positive control (B and E) and negative control (C and D). Oocytes stained with TUNEL (A, B, C) and Hoechst 33342 (D, E, F). Note the DNA fragmentation, as evidenced by green chromatin in figure B. O: oocyte. Scale bars: 100 μm .

Figure 6 - Epifluorescent photomicrographic images of caprine oocytes stained with CellTracker[®] Blue (A-F) to detect intracellular level of GSH: Oocytes cultured in α -MEM (A) or Amb 0.2 mg/mL (B) (both without supplements), in supplemented α -MEM⁺ (C) or in Amb 0.2⁺ mg/mL (D) and in supplemented α -MEM⁺ + FSH (E) or Amb 0.2⁺ + FSH (F) and Intracellular glutathione (GSH) relative level (pixel/oocyte) in goat oocytes after 12 days of in vitro culture in α -MEM or *Amburana cearensis* extract (0.2 mg/mL), both in the absence or presence of supplements and/or FSH (G). Scale bars: 75 μ m.

(^{A,B,C}) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

Figure 7 - Epifluorescent photomicrographic images of caprine oocytes stained with MitoTracker[®] Red (A-F) to detect intracellular level of active mitochondria: Oocytes cultured in α -MEM (A) or Amb 0.2 mg/mL (B), both without supplements, in supplemented α -MEM⁺ (C) or in Amb 0.2⁺ mg/mL (D) and in supplemented α -MEM⁺ + FSH (E) or Amb 0.2⁺ + FSH (F) and Intracellular mitochondrial activity relative level (pixel/oocyte) in goat oocytes after 12 days of in vitro culture in α -MEM or *Amburana cearensis* extract (0.2 mg/mL), both in the absence or presence of supplements and/or FSH (G). Scale bars: 75 μ m.

(^{A,B,C}) Different letters denote significant differences among treatments ($P < 0.05$).

Figure 1

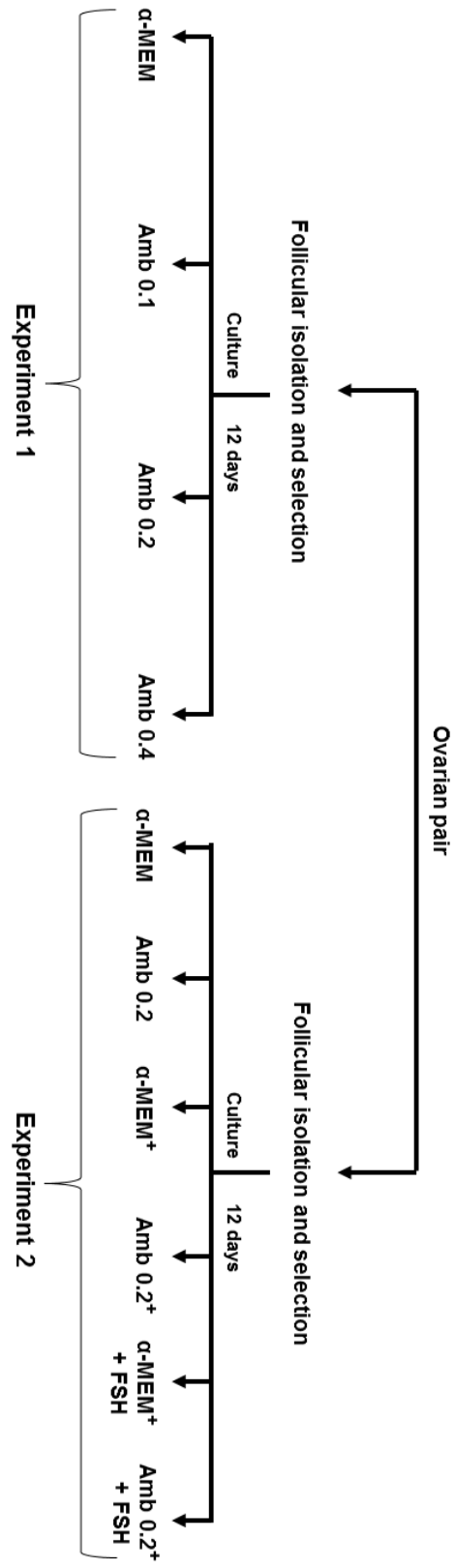


Figure 2

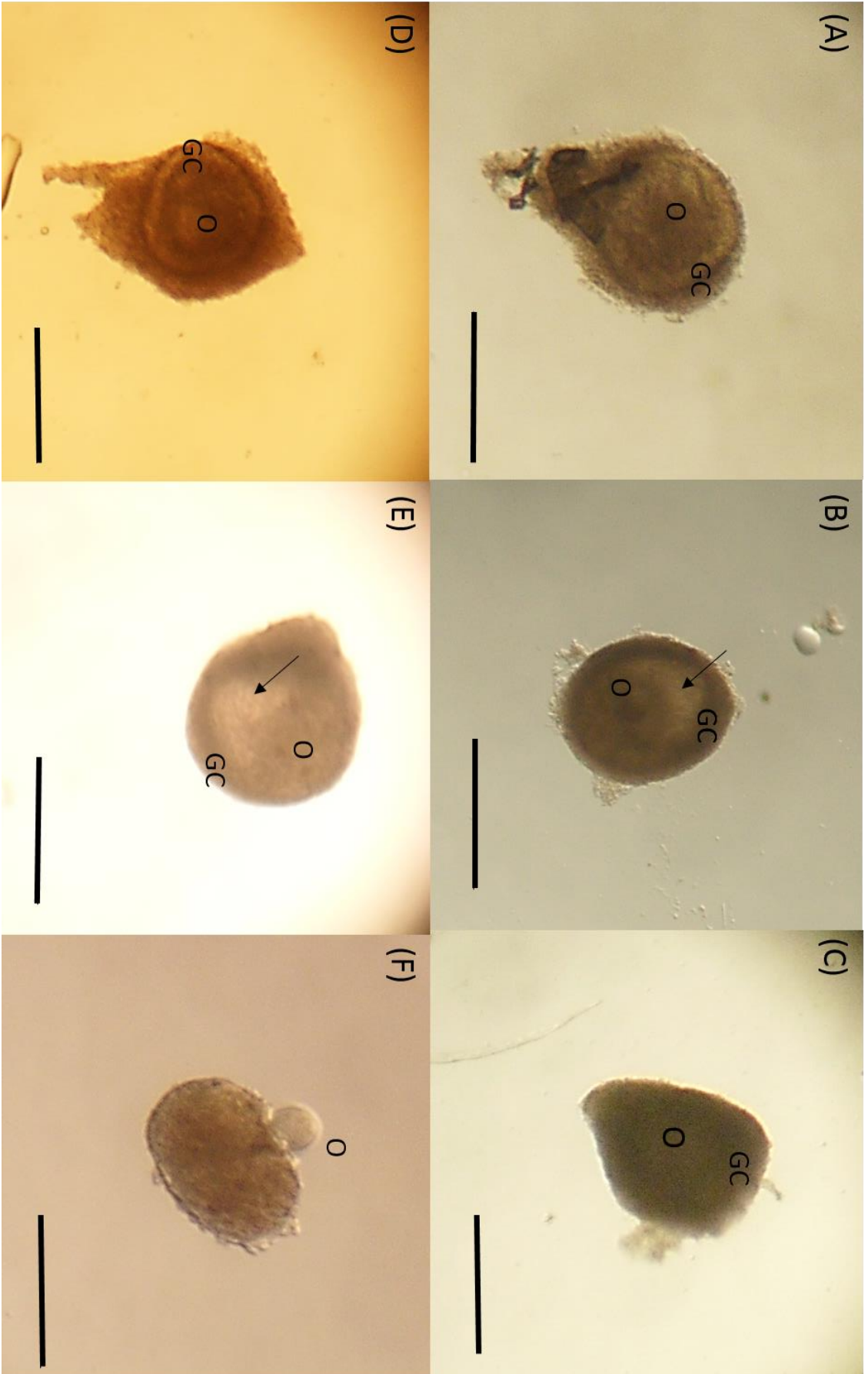


Figure 3

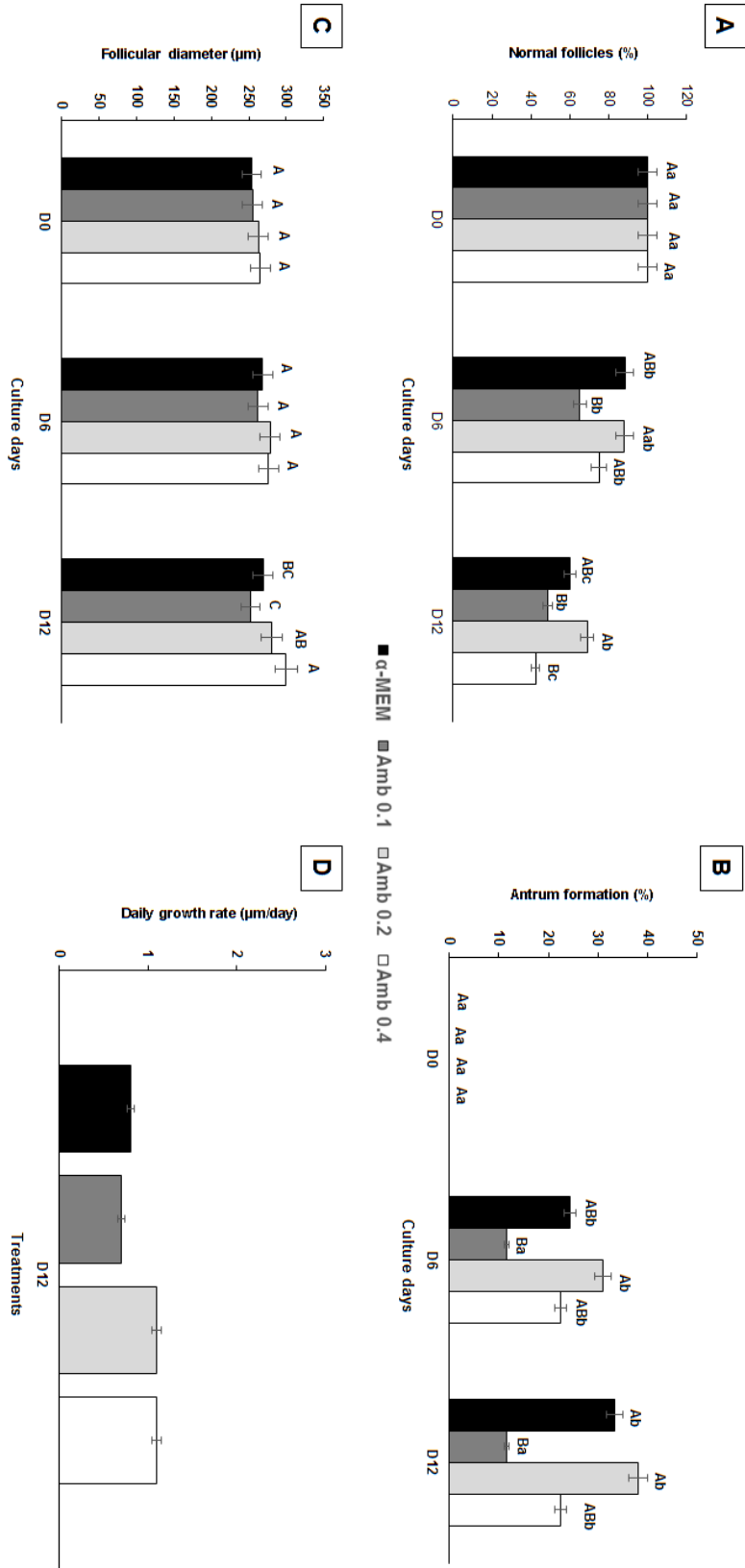


Figure 4

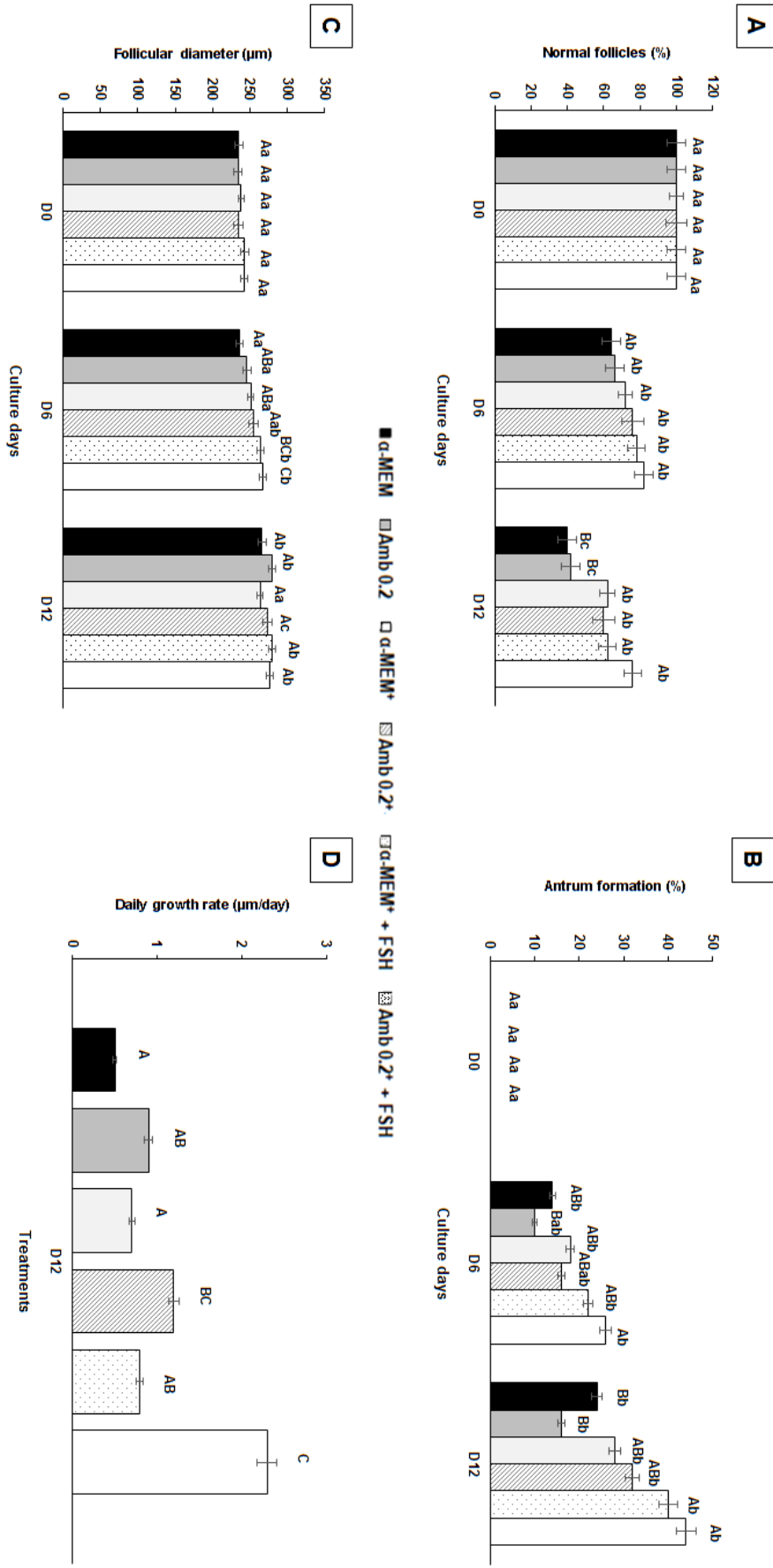


Figure 5

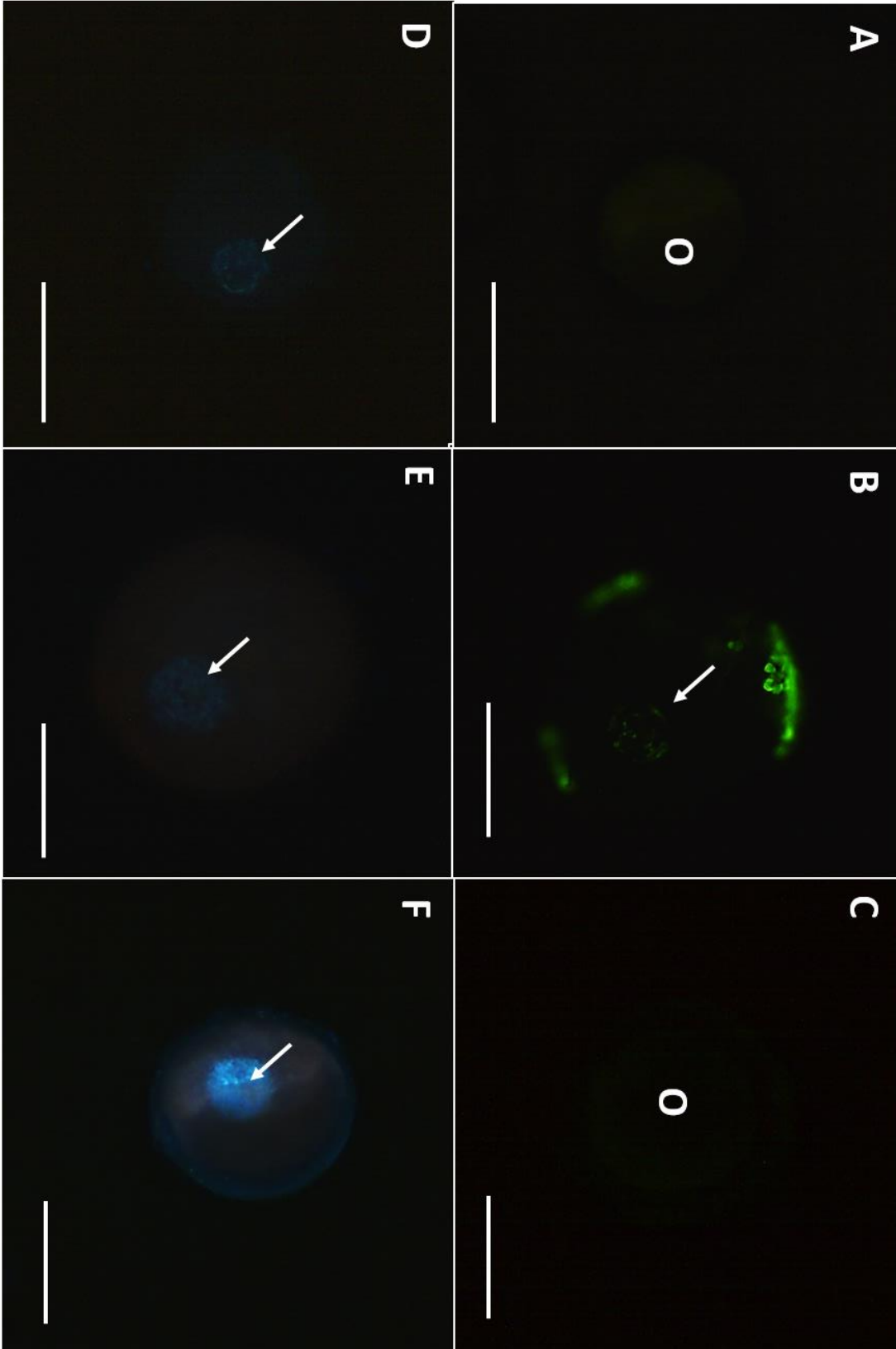


Figure 6

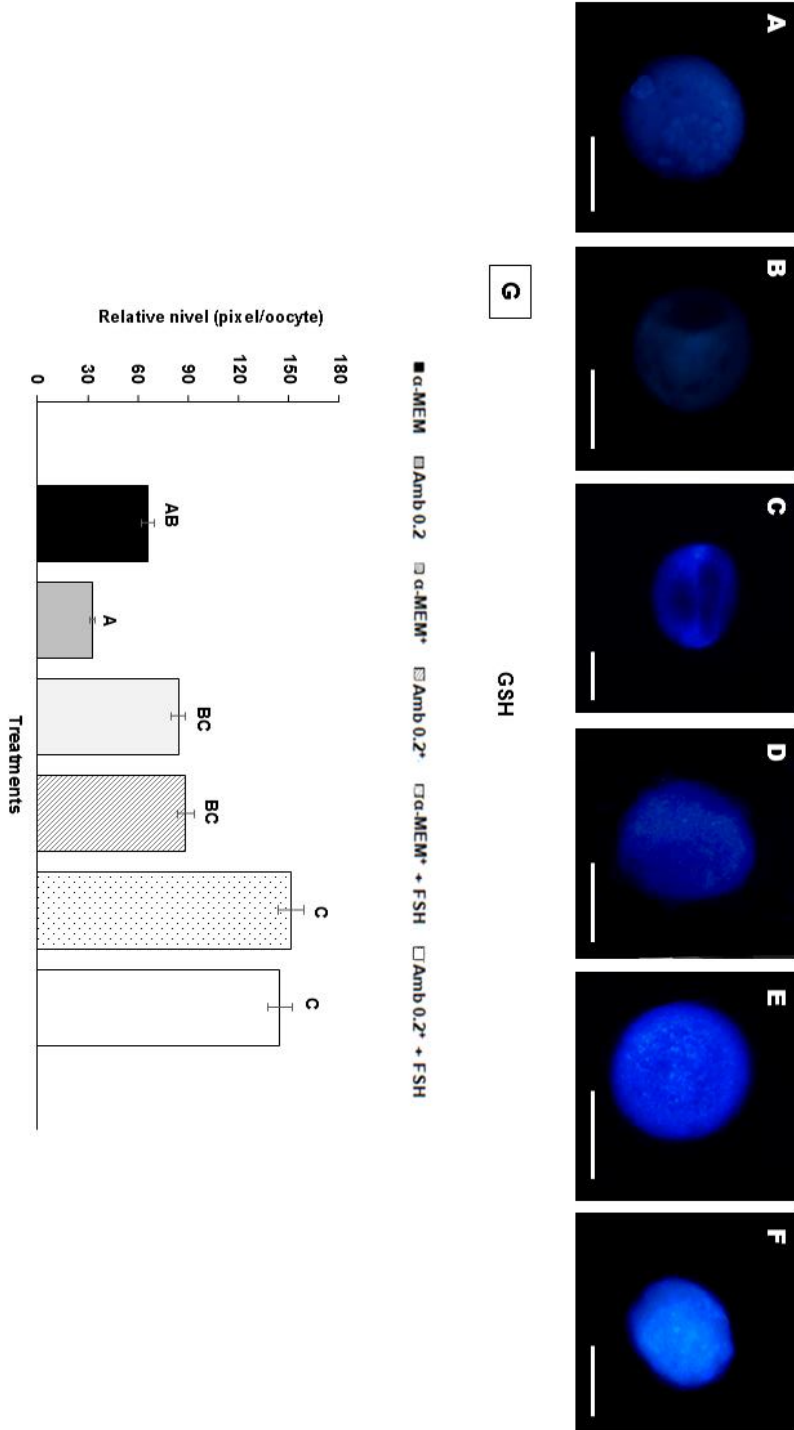


Figure 7

